

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**Correlación de los parámetros del Ensayo Cometa y
dosis de radiación ionizante en células mononucleares
sanguíneas humanas expuestas in vitro en la
evaluación del daño al ADN, Lima 2016**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Lenin Vladimir RUEDA TORRES

ASESOR

Yesica LLIMPE MITMA DE BARRÓN

Lima - Perú

2017

“Correlación de los parámetros del Ensayo Cometa y dosis de radiación ionizante en células mononucleares sanguíneas humanas expuestas *in vitro* en la evaluación del daño al ADN, Lima 2016”

Autor

Rueda Torres Lenin Vladimir

Asesora

Mg. Yesica Llimpe Mitma de Barrón

Dedicatoria: A mi abnegada y luchadora madre, Amanda Torres Ingaruca y a Lucero, la estrella que apareció para iluminar mi camino.

Agradecimientos

Quiero agradecer sobre manera, a todas las personas que contribuyeron a que este proyecto se haga realidad. En primer lugar, al Blgo. Marcos Espinoza Zevallos, por abrirme las puertas de su preciado laboratorio y guiarme en el interesante mundo, ajeno a mi formación, de la dosimetría biológica de las radiaciones ionizantes.

De igual modo va mi agradecimiento al Dr. T.M. Jaime Rosales Rimache por sembrar la semilla de la investigación en mi periodo preprofesional en el INS y darme la oportunidad de ejecutar este trabajo.

Finalmente van mis agradecimientos a mi asesora Mg. Yesica Llimpe Mitma de Barrón y al profesor Dr. T.M. Heli Jaime Barrón Pastor por los consejos, el apoyo constante, la paciencia y dedicación en el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
CAPÍTULO I.....	12
INTRODUCCIÓN	12
1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES.....	13
1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	14
1.3 OBJETIVOS.....	15
1.4 BASES TEÓRICAS	16
1.4.1 Desarrollo histórico del Ensayo cometa	16
1.4.2 Ventajas y desventajas del Ensayo Cometa.	19
1.4.3 Procedimiento e implicancias analíticas del ensayo cometa alcalino.....	20
1.4.4 Principales parámetros del Ensayo Cometa.	26
1.4.5 Estudios interlaboratorios con el Ensayo Cometa.	29
1.4.6 Relaciones dosis-respuesta en los estudios de la ECVAG.....	30
1.4.7 Interacción de la radiación con el ADN	31
1.5 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS	32
1.6 HIPÓTESIS	33
CAPÍTULO II	34
MÉTODOS	34
2.1 DISEÑO METODOLÓGICO.....	35
2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	35
2.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	35
2.1.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	35
2.1.4 VARIABLES.	36
2.1.5 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS. ..	37
2.1.6 PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS	39
2.1.7 CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	45
CAPÍTULO III.....	46
RESULTADOS.....	46
3.1 Recuento y viabilidad celular.....	47
3.2 Análisis de resultados del ensayo cometa alcalino.....	48
3.2.1 <i>Tail Intensity</i> (TI).....	49
3.2.2 <i>Tail lenght</i> (TL).....	55
3.2.3 <i>Olive Tail moment</i> (OTM)	59

CAPÍTULO IV	63
DISCUSIÓN	63
CAPÍTULO V.....	67
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS.....	79

LISTA DE TABLAS

Tabla n °.1 Lista de los diversos parámetros del Ensayo Cometa utilizados en la literatura publicada.....	26
Tabla n °.2 Categorización de los niveles de dosis de radiación en base a los efectos biológicos propuesta por la UNSCEAR.....	31
Tabla n °.3 Tiempos de irradiación calculados por cada dosis de radiación en dos etapas del estudio.....	42
Tabla n °.4 Recuento y viabilidad celular de CMSP por cada ensayo de irradiación.....	47
Tabla n °.5 Numero de nucleoides colectados por las tres laminas correspondientes a una dosis de tratamiento.....	48
Tabla n °.6 Estadística descriptiva de los valores del parámetro <i>Tail Intensity</i> por dosis de radiación ionizante, subdividido por caso.....	50
Tabla n °.7 Coeficientes de correlación y regresión lineal de las curvas dosis efecto con el parámetro <i>Tail Intensity</i> por cada caso.....	54
Tabla n °.8 Estadística descriptiva de los valores del parámetro <i>Tail lenght</i> por dosis de radiación ionizante, subdividido por caso.....	55
Tabla n °.9 Coeficientes de correlación y regresión lineal de las curvas dosis efecto con el parámetro <i>Tail length</i> por cada caso.....	58
Tabla n °.10 Estadística descriptiva de los valores del parámetro <i>Olive Tail moment</i> por dosis de radiación ionizante, subdividido por caso.....	59
Tabla n °.11 Coeficientes de correlación y regresión lineal de las curvas dosis efecto con el parámetro <i>Olive tail moment</i> por cada caso.....	62

LISTA DE GRÁFICOS

Figura n °.1 Tendencia temporal y factor de impacto de publicaciones sobre el ensayo del cometa en el periodo 1990-2013.....	17
Figura n °.2 Representación esquemática del ensayo cometa alcalino.....	21
Figura n °.3 Fotografía de un cometa con la definición de sus regiones según el programa <i>Comet Assay IV</i> (UK, <i>Perceptive Instruments</i>).....	28
Figura n °.4 Esquema del diseño de estudio para ejecución del ensayo cometa.....	41
Figura n °.5 Disposición de la fuente de irradiación, equipo de Teleterapia.....	43
Figura n °.6 Las imágenes de la apariencia de los “cometas” por cada dosis de irradiación (0, 2.5, 5 y 7 Gy).....	49
Figura n °.7 Histograma global de distribución de todos los valores del parámetro <i>Tail Intensity</i> por cada dosis de radiación (0, 2.5, 5 y 7 Gy).....	51
Figura n °.8 Diagrama general de cajas y bigotes para los valores del parámetro <i>Tail Intensity</i> por cada dosis de radiación (0, 2.5, 5 y 7 Gy).....	52
Figura n °.9 Curvas individuales dosis-efecto mediante el ensayo del cometa. Daño en el ADN (TI) inducido por irradiación gamma en un rango de 0 a 7 Gy.....	53
Figura n °.10 Total de curvas dosis-efecto con el parámetro <i>Tail intensity</i> bajo un mismo plano. Daño en el ADN (TI) inducido por irradiación gamma en un rango de 0 a 7 Gy.....	54
Figura n °.11 Histograma global de distribución de todos los valores del parámetro <i>Tail length</i> y por cada dosis de radiación (0, 2.5, 5 y 7 Gy).....	56
Figura n °.12 Diagrama de cajas y bigotes para los valores del parámetro <i>Tail length</i> por cada caso y dosis de radiación (0, 2.5, 5 y 7 Gy).....	57
Figura n °.13 Total de curvas dosis-efecto con el parámetro <i>Tail length</i> y dosis de irradiación gamma (0, 2.5, 5 y 7 Gy).....	58
Figura n °.14 Histograma global de distribución de todos los valores del parámetro <i>Tail length</i> y por cada dosis de radiación (0, 2.5, 5 y 7 Gy).....	60
Figura n °.15 Diagrama de cajas y bigotes para los valores del parámetro <i>Olive Tail moment</i> por cada caso y dosis de radiación (0, 2.5, 5 y 7 Gy).....	61
Figura n °.16 Total de curvas dosis-efecto con el parámetro <i>Olive tail moment</i> y dosis de irradiación gamma (0, 2.5, 5 y 7 Gy).....	62

RESUMEN

Introducción: El Ensayo Cometa (Electroforesis en gel de células individuales) es una técnica sencilla, rápida y novedosa para estimar el daño y reparación del ADN en células individuales. Se basa en el principio de migración electroforética de fragmentos de ADN, producto de las rupturas ocasionadas por la injuria genotóxica. La valoración individual de los “cometas” se realiza, comúnmente, con programas computarizados que extraen atributos geométricos y de intensidad de tinción. A pesar de su gran simplicidad, versatilidad y sensibilidad, aún existe disenso respecto al empleo de los parámetros y programas desarrollados para reportar y comparar los resultados de ésta técnica.

Objetivo: Evaluar la correlación de los tres parámetros más reportados del Ensayo Cometa Alcalino (*Tail intensity*, *Tail Length* y *Olive Tail Moment*) usando cuatro dosis de radiación ionizante, para evidenciar la capacidad de cada uno de ellos en la detección de niveles de daño en el ADN de células mononucleares (linfocitos y monocitos). **Método:** Para este propósito construimos seis curvas dosis-efecto, por cada parámetro. Las células mononucleares irradiadas (mediante irradiación gamma de una fuente de Co-60 con dosis de 0, 2.5, 5 y 7 Gy) provinieron de muestras sanguíneas extraídas a seis donantes aparentemente sanos.

Resultados: Los resultados muestran una correlación altamente significativa ($p < 0.05$) para cada uno de los parámetros. El R^2 promedio obtenido con el parámetro *Tail Intensity* (TI), $R^2 = 0.977$, $DE = 0.007$ fue superior comparado con los hallados con el *Olive Tail Moment* (OTM), $R^2=0.937$ $DE=0.036$ y el *Tail Length* (TL), $R^2 = 0.92$ $DE= 0.075$. Del mismo modo, en la variabilidad de las pendientes, el TI fue menor ($CV=25.48\%$) seguido del OTM ($CV=46.6\%$) y TL ($CV=41.78\%$).

Conclusión: Se concluye que existe buena correlación entre los parámetros del ensayo cometa y las dosis de radiación ionizante. Entre ellos, los parámetros TI y OTM son los indicadores de daño al ADN que tiene mejor correlación con el aumento de dosis de radiación. El primero es particularmente preferido debido a la menor variabilidad de las pendientes de curvas y las características propias en la

expresión de resultados. Se sugiere realizar más estudios para evaluar las limitaciones de la técnica y sus posibles aplicaciones.

ABSTRACT

Introduction: The Comet Assay (a single cell electrophoresis), is a simple, fast and novel technique to estimate DNA damage and repair in individual cells. It is based on the principle of electrophoretic migration of DNA fragments resulting from ruptures caused by genotoxic injury. The individual evaluation of the "comets" is commonly carried out with computerized programs that extract both geometrical attributes and staining intensity. Despite its great simplicity, versatility and sensitivity, there is still dissent regarding the use of the parameters and programs developed to report and compare the results of this technique.

Objective: To evaluate the correlation of the three main parameters of the Alkaline Comet assay (*Tail intensity, Tail Length and Olive tail moment*) using 4 doses of ionizing radiation, to demonstrate the capacity of each one of them in the detection of levels of DNA damage in mononuclear cells (lymphocytes and monocytes). **Method:** For this purpose, we construct six dose-effect curves for each parameter. The irradiated mononuclear cells (by gamma radiation from a Co-60 source with doses of 0, 2.5, 5 and 7 Gy) came from blood samples from six apparently healthy donors.

Results: The results show a highly significant correlation ($p < 0.05$) for each of the parameters. The average R^2 obtained with the parameter Tail intensity (TI), $R^2 = 0.977$, $SD = 0.007$ was higher compared to those found with Olive tail moment (OTM), $R^2 = 0.937$ $SD = 0.036$) and Tail Length (TL), $R^2 = 0.92$ $SD = 0.075$. Similarly, in the variability of the slopes, the TI was lower ($CV = 25.48\%$) followed by OTM ($CV = 46.6\%$) and TL ($CV = 41.78\%$).

Conclusion: It is concluded that there is a good correlation between the parameters of the comet assay and the doses of ionizing radiation. Among them, the TI and OTM parameters are the indicators of DNA damage that has a better correlation with the increase in radiation dose. The first is particularly preferred due to the lower variability of the curves slopes and the own characteristics in the expression of results. It is suggested to carry out more studies to evaluate the limitations of the technique and its possible applications.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

El genoma del ser humano se encuentra constantemente expuesto a diversos elementos, tanto exógenos como endógenos, que promueven múltiples daños en la estructura del ADN. Se estima que, diariamente, cada célula de nuestro organismo sufre 10^5 lesiones en el ADN (1). Lo cual sería letal si no fuera por la activación de mecanismos reparadores y reguladores que mantienen la homeostasis celular. Sin embargo, en las últimas décadas, las actividades humanas, sumado a otros factores, han contribuido a la proliferación de diversas fuentes de exposición genotóxica que comprometen seriamente el umbral de equilibrio fisiológico. Los efectos de esta exposición sobre la salud se evidencian a través de la mutagénesis y carcinogénesis.

Un aspecto relevante para reconocer y evidenciar las implicancias en la salud de tales fenómenos es el desarrollo de nuevos y potenciales marcadores biológicos capaces de revelar no solo la magnitud de la exposición a un agente genotóxico sino también el efecto y susceptibilidad que conlleva. En ese sentido, es importante el impulso de marcadores de alta sensibilidad y especificidad que reflejen, en gran medida, la interacción temprana entre el sistema biológico y un agente determinado, físico, químico o biológico (2). Por esta razón, es aún materia de investigación y desarrollo, nuevos enfoques para evaluar los daños en el ADN y entender los mecanismos subyacentes que influyen en la aparición de los trastornos.

Una de las técnicas más novedosas y sensibles empleadas en toxicología genética (3) es el “Ensayo cometa”, denominado metafóricamente así por la apariencia que adoptan las células tratadas análogas a los cuerpos astronómicos. Este método, rápido y relativamente simple, permite estimar el daño y reparación del ADN en células individuales (4)(5). El principio del método es la electroforesis aplicada sobre núcleos celulares suspendidos en una matriz de agar. La cuantificación del daño se realiza mediante el análisis de cientos de imágenes microscópicas de los núcleos, cuya disposición del ADN libre semejante a una “cola” anexa al núcleo celular indica la magnitud del daño.

El interés por esta técnica se ha incrementado significativamente en las dos últimas décadas (6). Gracias a su versatilidad que se manifiesta en las diversas aplicaciones y

versiones que se han desarrollado sobre el principio básico de su análisis. Sin embargo, debido a las características analíticas del ensayo aún no hay consenso en la adopción de un protocolo estándar y el empleo de criterios de valoración uniformes (7). Muy por el contrario, cada laboratorio que aplica la técnica lo hace en base a su experiencia, recursos y condiciones particulares. En consecuencia, los datos obtenidos entre tales fuentes están sujetos a gran incertidumbre y variabilidad. Esto implica un gran inconveniente si se pretende establecer la trazabilidad de resultados, valores de referencia, análisis comparativos interlaboratorios entre otros (8).

Ante tal problemática, se han manifestado investigadores y organizaciones internacionales como la ECVAG (*The European Comet Assay Validation Group*) y ESCODD (*The European Standards Committee on Oxidative DNA Damage*) que se han dedicado a la estandarización y evaluación de varios aspectos de la validación del ensayo (9,10). Dichas organizaciones recomiendan condiciones para mitigar la variabilidad. Una de las cuales, es la construcción de curvas de calibración estándar dosis-efecto, con radiación ionizante, para evidenciar la sensibilidad, correlación de parámetros y normalización de resultados respecto a ella.

Por lo tanto, creemos pertinente la ejecución del estudio *in vitro* del ensayo cometa a través de un modelo de inducción de daño genético en linfocitos de sangre periférica con irradiación gamma (Co 60). Se tomaron en cuenta el empleo de tres parámetros del Ensayo Cometa Alcalino (*Tail intensity*, *Tail moment*, *Tail lenght*) como indicadores de daño, los cuales se obtuvieron por análisis computarizado de imágenes microscópicas (*Comet Assay IV*) de la morfología nuclear e intensidad de tinción de las mismas

1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Considerando la falta de consenso en la estandarización del ensayo cometa y los parámetros que mejor expresen el efecto genotóxico. Creemos relevante la ejecución del presente estudio, como parte del proceso de implementación del método. La presente investigación es un primer paso dirigido a evaluar la relación dosis-respuesta mediante curvas de calibración adoptando el protocolo perteneciente a Laboratorio de investigación del Censopas-INS.

Los resultados permitirán evidenciar el comportamiento de los principales parámetros del ensayo, en función de los niveles de daño producto de las dosis de radiación. La evaluación del ensayo con un protocolo adaptado a las condiciones y particularidades de nuestro laboratorio contribuirá al proceso de validación y a largo plazo su aplicación apropiada en poblaciones expuestas, como marcador biológico alternativo de evaluación genotóxica.

Cabe destacar que a pesar de que el ensayo es frecuentemente manejado a nivel internacional, en el Perú son pocos los grupos en los cuales se encuentra implementado y empleado de forma activa en las investigaciones, de allí la pertinencia de realizar el estudio.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Determinar la correlación de los parámetros del ensayo cometa y las dosis de radiación ionizante en células mononucleares sanguíneas humanas en la evaluación del daño del ADN.

1.3.2 Objetivos específicos

- Evaluar las condiciones de rendimiento de aislamiento y viabilidad celular previo al Ensayo Cometa Alcalino.
- Describir los datos obtenidos del recuento de nucleoides por parámetro evaluado.
- Determinar la correlación del parámetro “*Tail Intensity*” y las dosis de radiación ionizante en células mononucleares sanguíneas humanas.
- Determinar la correlación entre el parámetro “*Tail length*” y las dosis de radiación ionizante en células mononucleares sanguíneas humanas.
- Determinar la correlación entre parámetro “*Olive Tail moment*” y las dosis de radiación ionizante en células mononucleares sanguíneas humanas.
- Establecer comparaciones de las medidas de correlación.

1.4 BASES TEÓRICAS

1.4.1 Desarrollo histórico del Ensayo cometa

Los métodos precedentes para el estudio y evaluación de las rupturas de simple y doble hebra en el ADN se basaban en técnicas tradicionales de elusión, filtración, sedimentación y desenrollamiento alcalino del ADN (11). Estos métodos emplean isótopos radiactivos para el marcaje y detección de hebras de ADN. Por lo tanto, al día de hoy están prácticamente en desuso por la complejidad y riesgo que representan. El avance de la química y microscopía de fluorescencia fueron determinantes en el surgimiento de nuevas alternativas para el estudio y evaluación de los daños al ADN. Dos investigaciones importantes se asocian estrechamente en la concepción del ensayo (12,13).

El primero, desarrollado por Peter Cook (12) en 1976, cuyo trabajo se enfocó en la caracterización de la estructura nuclear desproteínizada (acuñada “nucleoide”) a base de tratamientos con alta concentración de sales y detergentes. El segundo, en 1978 por Rydberg and Johanson, (13) quienes idearon la primera estimación novedosa del daño en el ADN en células irradiadas embebidas en agarosa. Mediante el uso de la tinción de naranja de acridina. La magnitud del daño fue cuantificada por espectrofotometría, en base a la proporción de fluorescencia verde (ADN de doble hebra) y roja (ADN de una sola hebra) producto de la capacidad del colorante para discriminar entre ambas formas de ADN.

Con estos dos precedentes se logró sentar las bases para la gesta del ensayo, que en 1984 publicaron, dos investigadores suecos, Ostling y Johanson, titulado “*Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*” (14), con el cual se les atribuye la invención del método inicialmente conocido como “Electroforesis en gel de células individuales” (SCG o SCGE, siglas en inglés) ahora comúnmente llamado “Ensayo Cometa”. La aplicación de la técnica electroforética sobre las células con daño inducido (linfocitos) embebidas en agarosa revelaron la presencia de fragmentos de ADN libres producto de la exposición a radiación.

La morfología que toman las estructuras al microscopio toman la apariencia de cometas astronómicos. Por ello, Olive et al. (1989) acuña el popular nombre del ensayo e introduce una modificación a las condiciones del ensayo. Esta variante se basó en el pH del tratamiento electroforético. La cual, difiere de la versión alcalina del ensayo a pH >13 propuesta por Singh et al.(4) que detecta rupturas de ADN de simple y doble hebra. Olive et al. (15) formula la versión neutra, con electroforesis a pH 8,3. Esta modificación se planteó para evaluar solamente el tipo de daño de rupturas de doble hebra. Aunque este planteamiento se sustentó por un tiempo, hoy se sabe que en ambas metodologías evidencian rupturas de doble y simple hebra.

A comienzos de los años 90 más investigadores empezaron a interesarse en este método. La productividad científica se incrementó gradualmente con los años y varios campos científicos integraron el ensayo con potenciales aplicaciones en sendas materias. Principalmente en áreas como genotoxicidad, ecotoxicología, farmacología, monitoreo biológico, entre otros (16). Un estudio bibliométrico mundial de publicaciones científicas, con términos relacionados al ensayo cometa, revela notablemente dicha tendencia en el periodo 1990–2013 (figura 1) (6).

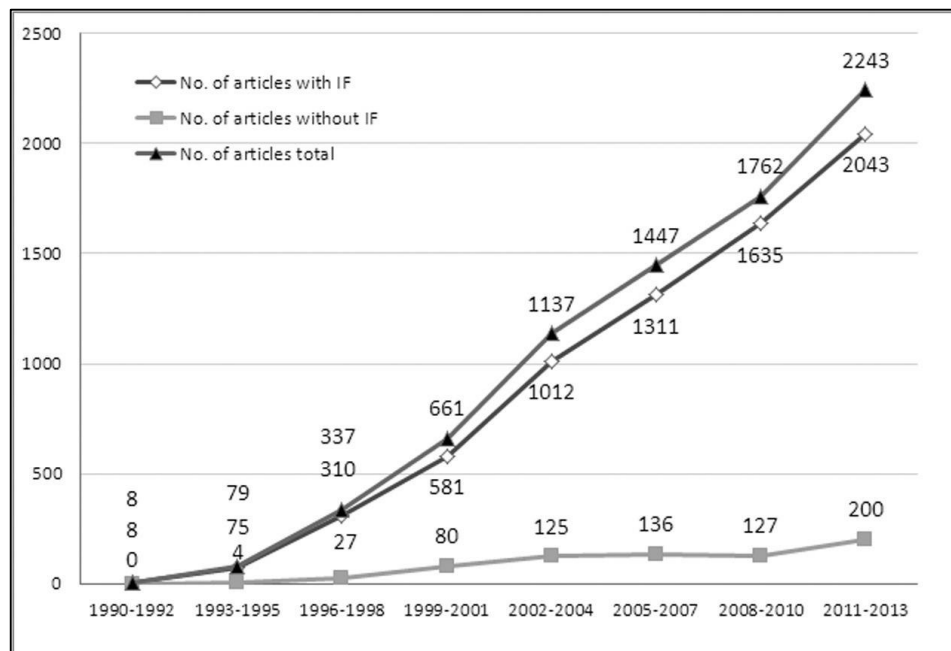


Figura n °.1 Tendencia temporal y factor de impacto de publicaciones sobre el ensayo del cometa en el periodo 1990-2013.

El predominio de publicaciones se estableció principalmente en países europeos. Inglaterra, Alemania e Italia encabezan la lista, mientras que entre otros continentes destacaba Estados Unidos. En las últimas décadas, países emergentes como China, Brasil e India también presentan un crecimiento importante respecto a la investigación del ensayo. En el Perú, a pesar de no estar considerado dentro del círculo de investigaciones de alto impacto (imagen, distribución de publicaciones, **Anexo A**). En los últimos años se han realizado algunos esfuerzos interesantes con el empleo del ensayo, aplicados principalmente a la evaluación de la exposición a genotóxicos ocupacionales (17–19).

Actualmente, existen numerosas variantes al ensayo original, consecuencia de la asociación con otras técnicas afines y al desarrollo de tecnologías que proporcionan un espectro de aplicaciones alternativas al modelo de evaluación de daño genético. Entre las nuevas propuestas tenemos al *cromosome assay* (20), *comet-FISH* (21), *cytometry comet assay* (22), *two-tailed Comet assay* (23) *automated comet assay* (24) entre otros. El enfoque del ensayo basado en el uso enzimas bacterianas es el que ha tenido mayor impacto (16), particularmente en el incremento de la especificidad del método para detectar diversos tipos de lesiones en el ADN.

La incorporación del proceso de digestión con enzimas de actividad glicosilasa o endonucleasa como la formamidopirimidina DNA glicosilasa (FPG), endonucleasa III, T4 endonucleasa V, Uracil DNA glicosilasa, permiten revelar diversos tipos lesiones específicas a través de rupturas de cadena de ADN que estas enzimas promueven (25). Mediante este procedimiento se ha establecido un modelo de evaluación novedoso de antioxidantes, deficiencias nutricionales, exposición solar, entre otras aplicaciones más.

Finalmente, independiente del método que adopte cada laboratorio, un aspecto que concierne a todos, es la capacidad de proveer confiabilidad, trazabilidad y reproducibilidad de los reportes de resultados. Lo cual, debido al carácter autónomo del ensayo, ha encontrado serias dificultades (26). Varios autores han estandarizado el método con variaciones en el manejo del tiempo, concentraciones en las soluciones, uso de diferentes insumos y equipos que hacen inviable consensuar un protocolo estándar. Incluso cuando se planteó condiciones homogéneas y controladas

de procesamiento entre laboratorios, las discrepancias de valores reportados entre ellos no disminuyeron, peor aún, en algunos casos se acentuaron (27).

En ese sentido, grupos como ECVAG (*The European Comet Assay Validation Group*) y ESCODD (*The European Standards Committee on Oxidative DNA Damage*) evalúan continuamente, mediante pruebas interlaboratorios, las fuentes de variación en la medición del daño del ADN con el ensayo cometa, sin querer "vender" el ensayo como la herramienta perfecta para las pruebas de genotoxicidad. Así mismo, expertos como, G. Brunbor, A. Collins entre otros (28–30) recomiendan formas de mitigar este problema y facilitar la aplicación de esta metodología. Una de ellas, a través de la construcción de curvas de calibración dosis-efecto con radiación ionizante para establecer el nivel de correlación propio de un laboratorio, normalizar resultados respecto a ella y generar un sistema de controles internos.

1.4.2 Ventajas y desventajas del Ensayo Cometa.

El ensayo cometa provee ciertas ventajas sobre otras pruebas que evalúan el daño genotóxico(31). Las cuales se pueden resumir en las siguientes.

La versatilidad del método provee la posibilidad de medir el daño en prácticamente cualquier tipo de célula eucariota con una mínima cantidad de las mismas (<10,000) que son suficientes para los más robustos análisis estadísticos. Por ende, una pequeña cantidad de muestra biológica equivalente a 200 µl para estudios con sangre total, es suficiente para ejecutar el ensayo (32). Además, el análisis de los datos colectados es a nivel de células individuales, por lo tanto, se puede estimar heterogeneidad de respuesta dentro de una población de células.

Es posible evaluar el daño en células no proliferativas, lo que representa también un gran beneficio en costos y tiempo sobre otras técnicas que si lo requieren. En ese sentido el procedimiento es económico, relativamente rápido y existen varias aplicaciones del método, que permiten la medición de diferentes lesiones en el ADN, así como su reparación. La sensibilidad del método para detectar daño en el ADN es considerable, se ha estimado en 1 ruptura en 10¹⁰ daltons (33)

A pesar de que la técnica ha sido ampliamente aceptada a nivel mundial (6), existen también algunas desventajas de su proceso. La primera de ellas hace referencia al estricto manejo y preparación de los reactivos, así como el número de variables asociadas que pueden afectar su óptimo desarrollo. Pues cualquier alteración en la concentración de la agarosa, el estado de las distintas soluciones de trabajo, el pH, la temperatura y los tiempos de cada paso, pueden cambiar drásticamente el resultado y sensibilidad de la técnica (34).

Otra desventaja es la imposibilidad de detectar el efecto de agentes aneugénicos (35), los cuales también son eventos de gran participación en los procesos carcinogénicos. Y la mayor y más nombrada desventaja, hace referencia a la falta de estandarización del procesamiento, análisis y representación de los datos que se obtienen, ya que aunque muchos investigadores abarcan el tema, proponen constantemente nuevas formas de valoración, sin definir un único proceso de evaluación que permita la comparación entre laboratorios (9).

1.4.3 Procedimiento e implicancias analíticas del ensayo cometa alcalino

Desde su origen con Ostling y Johanson, se han propuesto varios protocolos para la ejecución del ensayo cometa. Aunque aún no existe un consenso riguroso del procedimiento, generalmente se establecen una serie de etapas, en la fase analítica, que en orden secuencial son; aislamiento y embebido de células, lisis celular, tratamiento alcalino, electroforesis, neutralización y coloración para su consecuente análisis microscópico. Varios investigadores han evaluado las consideraciones técnicas de cada paso con el fin de establecer puntos críticos y sus implicancias en los resultados finales. En consecuencia, se han planteado recomendaciones que deben tomarse en cuenta en la práctica del ensayo, más aún cuando no se manejan sistemas de control de calidad. En la imagen (figura 2) se representa el esquema general del procesamiento.

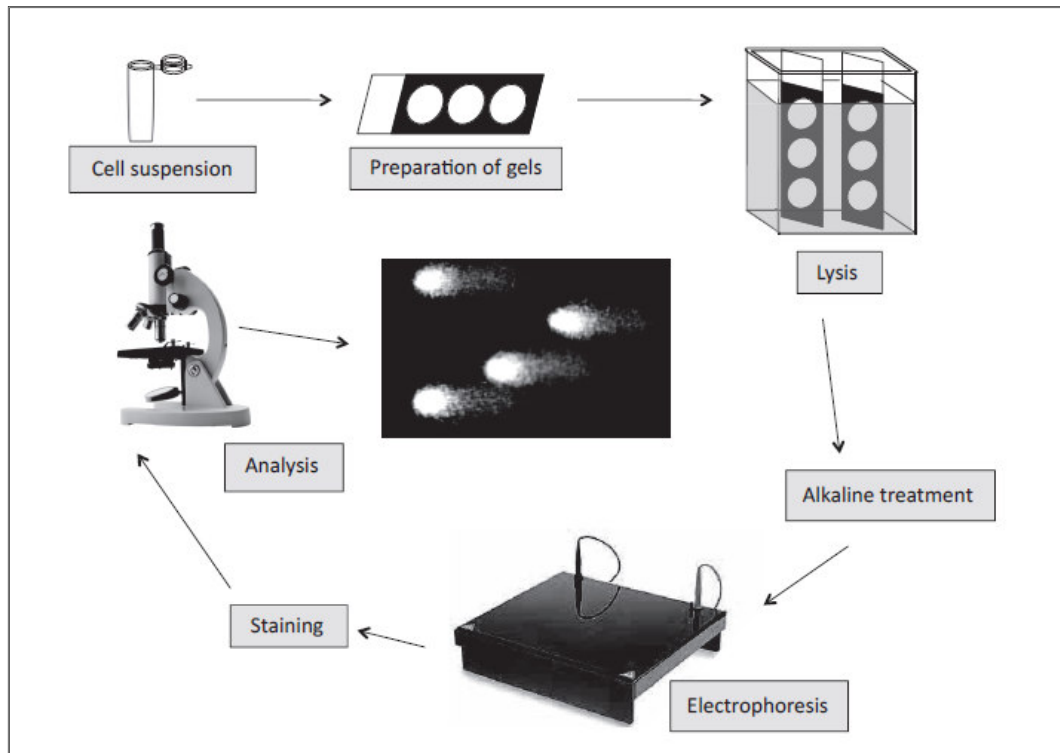


Figura n °.2 Representación esquemática del ensayo cometa alcalino

1.4.3.1 Aislamiento y embebido celular.

El ensayo tiene la ventaja de emplear, una mínima cantidad de cualquier tipo de células eucariotas dispuestas individualmente en suspensión. La variedad de tipos de células que se han probado es amplia y los reportes abarcan desde el uso de células de biopsias, raspado de epitelio bucal, cultivos celulares, espermatozoides, plantas, linfocitos de sangre periférica entre otros (36). La muestra de sangre viene siendo la fuente de mayor uso, debido a su facilidad de obtención y las características de las células (linfocitos y monocitos) que se aíslan, principalmente su distribución integral en el organismo y estadio de quiescencia.

El aislamiento, generalmente, se obtiene mediante centrifugación por gradientes de densidad. Los principales medios comerciales que se emplean para este propósito son, Histopaque®, Percoll, Lymphoprep™, CPT™, entre otros. Los cuales separan las células mononucleares (linfocitos y monocitos) con suficiente rendimiento y viabilidad para el ensayo. Tres mil a cinco mil células por microlitro y con viabilidad superior al 95 % si se manipulan adecuadamente.

La suspensión celular es embebida en agarosa de bajo punto de fusión (*LMPA* siglas en inglés) cuyas concentraciones de uso varían por cada laboratorio. Generalmente van de 0.5 % a 1 % en PBS. Este factor afecta la sensibilidad del ensayo, puesto que un aumento en la densidad de la agarosa disminuye significativamente la migración del ADN (37). La mezcla, luego, es dispensada sobre láminas portaobjeto, previamente cubiertas con una fina capa de agarosa normal 1 % o adquiridas comerciales como *GelBond® film*.

El formato de láminas también es variable, convencionalmente esta puede contener uno o dos minigeles, sin embargo, Shaposhnikov, et al. (38) ha propuesto el formato con 12 minigeles para mayor eficiencia del ensayo mientras que Gutzkow et al. (39) un formato con 96 minigeles.

1.4.3.2 Lisis celular.

Luego de solidificar los minigeles de *LMPA* por 10 minutos en refrigeración, se retiran cuidadosamente las laminillas cubreobjetos y se sumergen en el buffer de lisis cuya composición básica incluye NaCl 2.5 M, Tris, 10 Mm, EDTA, 0.1 M y Tritón X-100, 1 %, todo en solución a pH 10. La exposición de las células a estos agentes (sales y detergentes), durante una hora como mínimo, a 4 °C, ocasiona la ruptura de la membrana citoplasmática y nuclear, liberación de organelas y depleción de proteínas histónicas. Algunos autores han propuesto incluir en el medio de lisis, crioprotectores como el dimetil sulfoxido (DMSO) o N-lauril sarcosinato. Sin embargo, en la práctica, estudios demuestran que no contribuyen significativamente en la evaluación final de resultados (34).

El producto es el ADN libre superenrollado en la matriz nuclear, ahora denominado “nucleoide”. Estas estructuras se encuentran inmersas uniformemente en la agarosa de bajo punto de fusión. Se debe tener en cuenta que los nucleoides localizados en los extremos del minigel tienen mayor probabilidad de formar artefactos debido al fenómeno llamado “*Edge effects*”(32). En consecuencia, es preferible restringir el análisis de nucleoides dentro de un límite central del minigel.

1.4.3.3 Tratamiento alcalino.

Este es un paso representativo del ensayo cometa, versión alcalina, en el que se somete a los nucleoides a un tratamiento para denaturar y desenrollar el ADN. Mediante este proceso también se pueden evidenciar sitios alcalinos lábiles (SAL) presentes en el ADN, a través de los fragmentos liberados. Posterior a la lisis, los preparados se incuban en el buffer de electroforesis que incluye NaOH 0.3 M y EDTA 1 mM, el pH es mayor a 13 y la duración del tratamiento es variable, generalmente entre 20 a 40 minutos. Esta etapa es crítica, estudios revelan que, la temperatura y el tiempo de tratamiento influyen significativamente en la lectura de cometas (37).

1.4.3.4 Electroforesis.

Este es probablemente el paso más crítico de todo ensayo (36). La electroforesis se realiza inmediatamente luego del tratamiento alcalino, en una cámara horizontal con un volumen de buffer pH>13 (misma solución del tratamiento alcalino) suficiente para que cubra completamente las láminas y establezca los parámetros de configuración establecidas (voltaje y amperaje). La configuración de voltaje es dependiente de la longitud de la cámara de electroforesis, generalmente varía de 0.8 a 1.2 V/cm (37). En este caso se necesita que el ADN migre solo una fracción de milímetros, lo que se consigue con la exposición de los portaobjetos por un corto periodo, entre 5 a 30 minutos (41)

Mediante la fuerza que ejerce el campo eléctrico, los fragmentos libres y bucles relajados de ADN tenderán a migrar con mayor velocidad hacia el ánodo. De tal forma que la disposición de estas conforme una estela anexada al nucleoide la cual en suma asemeja a la apariencia de un cometa. Debido a las considerables variables que involucra este proceso, investigadores han propuesto una serie de recomendaciones que tratan de mitigar el efecto de la variabilidad intraensayo. Un aspecto de consideración es el mantenimiento de la temperatura homogéneamente fría y constante en la plataforma de electroforesis donde se colocan las láminas, puesto que se ha observado que este factor está considerablemente asociado a la variación en los resultados (40).

1.4.3.5 Neutralización coloración y análisis de cometas.

Luego de culminada la electroforesis, se realizan lavados en buffer Tris 0.4 M pH 7.5 – 8.0, para neutralizar el efecto de la alcalinidad del proceso anterior. Mediante este tratamiento se revierte la desnaturalización del ADN. Las hebras integra tienden a constituirse en doble hélice mientras que las que se desplazaron fuera del nucleóide permanecen en su estado relajado, en simple o doble hebra. Finalmente, se tiñen las láminas, para lo cual hay una serie de alternativas con diferente desempeño y sensibilidad. Se han reportado el uso de colorantes hematológicos como Giemsa (42) y tinción con plata (43) para microscopía óptica convencional. Sin embargo, lo recomendable y usualmente empleado son las tinciones fluorescentes, que mejoran la sensibilidad y calidad de imágenes. Entre los más usados destacan; naranja de acridina, bromuro de etidio, DAPI, YOYO, Sybr Green, Sybr Gold.

1.4.3.6 Análisis, valoración e interpretación de resultados.

La valoración del daño genético, con el ensayo cometa, está basado en atributos geométricos; en función a la forma, tamaño y densidad del ADN distribuido al interior de los nucleóides. Los métodos de análisis han ido evolucionando en paralelo al desarrollo de la tecnología e informática, los cuales influyen actualmente en los sistemas de conteo, aunque aún se mantienen métodos tradicionales.

Inicialmente Ostling y Johanson (14) emplearon un sistema sofisticado de análisis de imágenes. Ellos presentaron sus resultados mediante lecturas de fluorescencia con un fotómetro, expresado en un cociente de medidas entre la cabeza del cometa y a un punto 50 μm alejado del centro de esta. En cambio Singh et al. (1998)(4) utilizaron un micrómetro ocular para cuantificar la longitud de la migración del ADN (longitud de la cola) y así establecer el grado de daño. Posteriormente se crearon muchos parámetros para valoración del daño genotóxico (Tabla n°.1) sin embargo, solo algunos tomaron real relevancia científica.

El primer programa de análisis de imágenes se describió en 1990 por Olive et al.(25) el cual fue esencial para hacer el ensayo más robusto, objetivo y para distinguir pequeñas diferencias entre subpoblaciones celulares. A su vez introdujo el concepto de “*Tail moment*”, un parámetro para describir la migración del ADN. Este llegó a ser conocido como OTM (Olive Tail moment) y es particularmente útil para describir la heterogeneidad dentro de una población celular, ya que puede captar variaciones en la distribución de ADN dentro de la “cola”.

No obstante, actualmente el parámetro “*Tail intensity*” o “% ADN” en la cola, es el más empleado (44). Este representa mejor el daño, debido a que está relacionado linealmente con la frecuencia de rupturas en un amplio rango dinámico. Además, es fácil de conceptualizar, a diferencia de los otros parámetros que no presentan unidades de magnitud. El *Tail Intensity* se muestra como porcentaje de 0 a 100.

Por otro lado, el enfoque de análisis por simple observación directa al microscopio de fluorescencia, se realiza mediante asignación de un valor a cada nucleoide en función de la forma y longitud de su cola. La determinación del daño depende de la pericia y objetividad del observador, el cual emplea categorías de puntuación predeterminadas. Collins et al. (1995) (45) propuso el primer sistema de unidades arbitrarias cuya escala es de 5 valores, desde 0, sin daño, a 4, máximo daño. El recuento de 100 nucleoides da una puntuación global entre 0 y 400 unidades arbitrarias. Otra propuesta importante es la de Kobayashi et al. (1995) (46) al igual con 5 categorías (desde 1 a 5). A pesar de lo que representa este tipo de análisis, algunos estudios han reportado buena correlación entre la estimación por unidades arbitrarias y el análisis computarizado, principalmente con el parámetro *Tail intensity*.

Tabla n °.1 Lista de los diversos parámetros del Ensayo Cometa utilizados en la literatura publicada

· Cell area	· Head optical intensity
· Comet coefficient of variance	· Head skew
· Comet distribution moment	· Head standard deviation
· Comet extent	· Length/height
· Comet inertia	· Olive tail moment
· Comet mean	· Tail coefficient of variance
· Comet mode	· Tail distribution moment
· Comet optical intensity	· Tail DNA
· Comet skew	· Tail extent
· Comet standard deviation	· Tail extent moment
· Head coefficient of variance	· Tail inertia
· Head distribution moment	· Tail length
· Head DNA	· Tail mean
· Head extent	· Tail mode
· Head inertia	· Tail optical intensity
· Head mean	· Tail skew
· Head mode	· Tail standard deviation

Fuente: Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN. Comet Assay measurements: A perspective. Cell Biol Toxicol. 2009;25(1):53–64

1.4.4 Principales parámetros del Ensayo Cometa.

1.4.4.1 Tail length (Longitud de la cola)

La longitud de la cola del cometa es, evidentemente, el parámetro geométrico más representativo, simple y fácil de entender del daño genotóxico con el ensayo cometa. Esta medición se expresa en unidades absolutas (μm o píxeles) y se asoció intuitivamente con el ensayo desde sus inicios. Actualmente todos los programas de análisis de imágenes proveen la medición bajo el mismo principio, pero con algunas diferencias referidas a la definición de las regiones del cometa (47). En ese sentido, el usuario debe considerar las particularidades de su propio *software* para el análisis y reporte de sus resultados (figura n° .3). La desventaja de su utilidad se restringe al estrecho rango de daño que evalúa. Puesto que se ha evidenciado que a dosis altas de exposición de algún agente genotóxico, la cola no aumenta, pero si se sigue saturando de ADN (44). Además, células de diferentes tejidos o especies pueden diferir sustancialmente en la longitud de la cola

1.4.4.2 *Tail Intensity* o % *DNA in Tail* (Intensidad de la cola o porcentaje de ADN en la cola)

Es el parámetro más utilizado y recomendado actualmente. Fue introducido por Müller et al. en 1994 (48) y se basa en la intensidad de la luz emitida por la cola del “cometa”. Se denomina parámetro de intensidad luminosa y está en función de las representaciones de medida de la luz, la cual se expresa en escala de grises (47). El parámetro se calcula en base a una proporción entre la intensidad de luz emitida por la cola y la intensidad total del cometa (cabeza y cola). Este parámetro muestra buena correlación lineal en un amplio rango de rupturas de ADN. Además, facilita la mejor interpretación del daño genético, al establecer valores relativos porcentuales (0 a 100%) que conceptualizan mejor la idea del daño.

Este parámetro ha sido empleado frecuentemente en estudios de monitoreo biológico (49) y en estudios interlaboratorios puesto que es más fácil de comparar y evidenciar condiciones de ensayo similares. Por otro lado, también ha sido considerado para el establecimiento de valores de referencia junto con las unidades arbitrarias con la cual tiene muy buena correlación (7).

1.4.4.3 *Tail moment* (Momento de la cola):

Entre los parámetros característicos del ensayo Cometa, los “*Tail moments*” (tanto *Olive Tail Moment* como *Extent Tail Moment*) son unos de los más utilizados y populares. Estos toman en cuenta tanto la longitud del cometa como la intensidad de la tinción. El concepto fue introducido por Olive et al. en 1990 (50) asociado al desarrollo de sistemas de análisis de imágenes. Se argumentó ser un parámetro informativo para describir la imagen del cometa, puesto que partir de su cálculo se dedujo que reflejaría bien imágenes irregulares con una cola corta que contenga una alta fracción de ADN y una larga con una baja fracción de ADN (51). Así mismo se ha reportado, en estudios dosis respuesta, que este parámetro muestra mayor sensibilidad que el *tail length*, (52).

Sin embargo, el problema de estos parámetros es la falta de unidades de medición e es imposibilidad de conceptualizar el valor que toman en la imagen de un cometa

(correspondiente al nivel de daño). Además, reportes indican que el valor del *Tail moment* difiere considerablemente entre laboratorios (53). En general, se tiene en cuenta para el cálculo del, *Tail extent moment*, el producto de la longitud de la cola (*tail length*) y el porcentaje de ADN en la cola (*% DNA in tail*). Y para el *Olive tail moment (OTM)*, el *% DNA in tail* multiplicado por la distancia horizontal entre el centro de masa de la cabeza y cola.

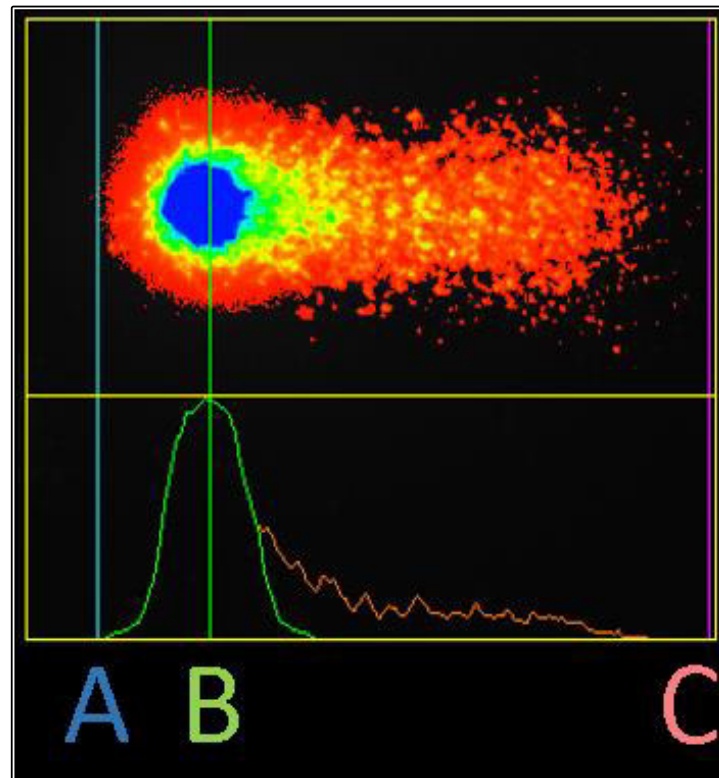


Figura n °.3 Fotografía de un nucleoide “cometa” con la definición de sus regiones según el programa *Comet Assay IV* (UK, *Perceptive Instruments*). La línea azul “A” marca el comienzo de la cabeza, la línea verde “B” marca el centro de gravedad de la cabeza, y la línea magenta “C” marca el final de la cola

Parámetros calculados bajo la definición de las regiones establecidas y aplicables para este estudio:

- *Tail length* (TL): Distancia horizontal desde el centro de la cabeza (B) hasta el final de la cola (C)
- *Tail Intensity* (TI): Intensidad de fluorescencia de la cola (B-C) expresado como porcentaje del total del cometa.
- *Olive tail moment* (OTM): Producto del Tail Intensity y la distancia desde el centro de masa de la cola al centro de masa de la cabeza.

1.4.5 Estudios interlaboratorios con el Ensayo Cometa.

Varios expertos en el tema han destacado la necesidad de realizar estudios de validación internacional para evaluar la reproducibilidad intra e interlaboratorios e investigar las fuentes de variabilidad de los resultados con el Ensayo Cometa (28). En ese sentido, en el 2006 se conformó el Grupo Europeo para Validación del Ensayo Cometa (*The European Comet Assay Validation Group, ECVAG* en inglés) con 14 laboratorios asociados que participan regularmente en los estudios de validación. Ellos han producido una serie de publicaciones que se han enfocado en diversos aspectos analíticos del ensayo, así como evaluaciones de la variabilidad. Se presenta en síntesis cada estudio desarrollado.

Estudio n°. 1, *Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG interlaboratory validation trial*, 2010 (9). Comprende la evaluación de tres aspectos técnicos del ensayo, los cuales se dividen en dos secciones. En primer lugar, evaluaron la influencia de la tinción y puntuación de láminas patrón prefabricadas con diversos grados de daño al ADN. Y en la segunda, se evaluó la variabilidad entre laboratorios y la posibilidad de reducción de la misma mediante normalización de resultados. El diseño se basó en la distribución de muestras congeladas de células irradiadas de leucemia monocítica aguda humana, THP-1, a 12 laboratorios participantes para que las analizaran usando sus propios protocolos de ensayo.

Estudio n°. 2 *An ECVAG trial on assessment of oxidative damage to DNA measured by the comet assay*, 2010 (30). Investigaron la capacidad de 10 laboratorios participantes para detectar la relación dosis-respuesta en muestras ciegas que contuvieron ADN dañado por oxidación (8-oxoguanina) inducido con Fotosensibilizador Ro 19-8022. Se evidenció la variación interlaboratorios en el análisis del ADN dañado oxidativamente, con formamidopirimidina glicosilasa (FPG). Así mismo, se propuso la posibilidad de reducirla mediante el uso de curvas de calibración específicas del protocolo

Estudio n°. 3 *The effects on DNA migration by altering parameters in the comet assay protocol, including agarose density, electrophoresis conditions as well as*

durations of enzyme and alkaline treatments, 2011(37). Este estudio se enfocó en evaluar diferentes condiciones del protocolo que afectan la migración del ADN. Se consideraron las etapas más importantes del proceso y sus condiciones fueron ensayadas y definidas. El protocolo se estableció con la concentración final de agarosa en 1%, duración de 30 min en la incubación enzimática, 20 min de tratamiento alcalino, 1,2 V/cm en la fuerza del campo eléctrico, y duración de la electroforesis en 20 min.

Con todo ello, más la composición de las soluciones de referencia se estableció un protocolo estándar que posteriormente será puesto a disposición de los laboratorios participantes en el siguiente estudio, n°. 4. *Inter-laboratory variation in DNA damage using a standard comet assay protocol*, 2012. Los 14 laboratorios participantes analizaron muestras patrón codificadas, con sus propios protocolos como con el protocolo de referencia. La adherencia al protocolo estándar generó algunos problemas técnicos en 7 de los laboratorios participantes mientras que, en los otros, no se evidenció la reducción de la variabilidad.

Estudio, n°. 5 *Variation of DNA damage levels in peripheral blood mononuclear cells isolated in different laboratories*, 2014 (10). En este estudio se evaluó la variación interlaboratorios en la detección del daño en el ADN y la normalización de resultados con curvas de calibración. Se emplearon linfocitos de sangre periférica provenientes de 5 donantes sanos de diferentes países y se distribuyeron a 13 laboratorios participantes para que las analizaran con sus propios protocolos. El estudio demuestra consistentemente que la variación entre laboratorios se reduce notablemente por el cambio de unidades con la curva de calibración de referencia. El coeficiente de variación disminuyó de 68 a 26% para el ensayo cometa alcalino.

1.4.6 Relaciones dosis-respuesta en los estudios de la ECVAG.

En general, los estudios de la ECVAG (estudios del n° 1 al 5) se han caracterizado por la evaluación de la variabilidad interlaboratorios mediante un modelo basado en la detección y normalización de resultados en función a curvas de calibración dosis-efecto. Las muestras patrón suministradas a cada laboratorio participante fueron elaboradas a base a líneas celulares o linfocitos de sangre con niveles de daño

inducido por exposición controlada a radiación ionizante. Esta propuesta ha permitido revelar el nivel de dispersión de resultados y la capacidad de los participantes a la aplicación del Ensayo Cometa en diversos formatos. De este modo se identificaron fuentes de variabilidad y el establecimiento de unidades normalizadas de reporte.

La mayoría de laboratorios participantes fueron capaces de detectar la relación dosis-respuesta, aunque con una amplia variación en los reportes de resultados (*%DNA in tail*). En los estudios n°. 1 y 2, esta variabilidad se atribuyó a la influencia de los diferentes protocolos y al análisis de imágenes. En el estudio 1, la relación dosis-respuesta para las curvas de calibración fueron buenas ($R^2 = 0,987$, rango: 0,895-0,992) y significativas para 11 laboratorios ($P < 0,05$). Un solo laboratorio no alcanzó este el valor de significación ($P = 0,054$). En el estudio 2, todos los laboratorios participantes (diez) informaron relaciones dosis-dependientes significativas en las curvas de calibración ($R^2 = 0,970$, intervalo: 0,931 - 0,995, $P < 0,05$, ANOVA).

1.4.7 Interacción de la radiación con el ADN

Las radiaciones ionizantes son mutágenos físicos que se caracterizan por su capacidad de interactuar con la materia, liberando energía, excitando y produciendo ionización de los átomos y moléculas que constituyen el medio material. La magnitud dosimétrica fundamental es la dosis de radiación absorbida que expresa la cantidad de energía liberada por las radiaciones a una masa definida de materia. Su unidad es el Gray (Gy) (54) . La UNSCEAR 1986 (*United Nations Scientific Committee on the Effect of Atomic Radiation*) propuso rangos para las dosis en base a los niveles de daño u efectos biológicos (tabla 2).

Tabla n °.2 Categorización de los niveles de dosis de radiación en base a los efectos biológicos propuesta por la UNSCEAR.

Dosis	Gy
Baja	0 a 0.2 Gy
Media	0.2 a 2 Gy
Elevada	2 a 10
Muy elevada	Más de 10

Un aspecto cualitativo para la caracterización de las radiaciones ionizantes es su capacidad de liberación de energía, denominada Transferencia Lineal de Energía (*Linear energy transfer*, LET en inglés) que se define como la energía depositada por unidad de longitud recorrida. En base a ello se clasifican las radiaciones ionizantes en alta y baja LET. Los rayos X y gamma son considerados de baja LET (ligeramente ionizante) en cambio, los neutrones, protones y partículas cargadas pesadas son de alto LET.

La inducción de daño molecular al ADN, por radiación ionizante, tiene un gran impacto biológico por el papel que desempeña en la funcionalidad celular (55). La interacción se da mediante dos mecanismos, denominados “directo” e “indirecto”, en el primero, la molécula de ADN es la que absorbe íntegramente la energía transmitida por la radiación, también se denomina "teoría del impacto" o "efecto bala"(56), bajo esta condición, la molécula de ADN resulta excitada e ionizada, conduciendo, en ambos casos, a rupturas por radiólisis de doble o simple cadena, y otras alteraciones como entrecruzamiento del ADN con proteínas, pérdida de bases, dímeros de pirimidina, entre otros (54).

En cambio, en el mecanismo de interacción indirecta, la energía recae en otras moléculas del medio intracelular, fundamentalmente el agua (puesto que compone el 80% de la célula), la cual produce radicales libres altamente reactivos que pueden llegar a reaccionar con el ADN dando lugar a lesiones iguales a los de acción directa, este fenómeno es el mecanismo que tiene mayor impacto en el ADN (57), evidenciado por el gran número de lesiones que genera. (**Anexo B**)

1.5 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Transferencia Lineal de Energía:** (TLE): Medida de cómo se transfiere la energía, en función de la distancia de la materia expuesta a radiación. Un valor elevado de TLE indica que la energía se disipa dentro de una distancia pequeña.
- **Gray (Gy):** Unidad del SI de kerma y de dosis absorbida, igual a 1 J/kg. Sustituye al rad. 1Gy = 100 rad.

- **Agente aneugénico:** Agentes químicos que, a nivel molecular, impiden la fijación de las fibras del huso al cinetocoro y, por ende, el desplazamiento de cromosomas en anafase.
- **Agente genotóxico:** Agente que, a niveles subtóxicos de exposición, producen algún tipo de alteración en el material genético o en sus componentes asociados. Bajo este
- **Efecto genotóxico:** Efecto causado por un agente genotóxico.
- **Daño genético:** Pérdida, ganancia o reordenación de material hereditario ocasionado por la interacción de un agente genotóxico.
- **Toxicología Genética:** es una rama de la Genética o de la Toxicología que identifica y analiza la acción de aquellos agentes que, a niveles subtóxicos de exposición, producen algún tipo de alteración en el material genético o en sus componentes asociados
- **Nucleoide:** ADN genómico observado al final del procesamiento del ensayo cometa alcalino que no presenta daño asociado. Se observa en forma de acúmulo definido.
- **Electroforesis:** Procedimiento que consiste en la inducción de un campo eléctrico con el fin de separar moléculas en base a su carga eléctrica y masa.

1.6 HIPÓTESIS

Existe correlación entre los principales parámetros del ensayo cometa y las dosis de radiación ionizante.

CAPÍTULO II

MÉTODOS

2.1 DISEÑO METODOLÓGICO.

2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN.

Estudio cuantitativo, descriptivo correlacional

2.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

Diseño observacional, prospectivo, transversal

2.1.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.

El marco muestral se definió teniendo en cuenta la naturaleza del estudio, con la participación de seis personas voluntarias, a quienes se les extrajo una muestra de sangre periférica en tubos con heparina mediante punción venosa en la zona de flexión del antebrazo.

El estudio incluyó seis ensayos de irradiación además de dos pruebas piloto previstas para ajustar tiempos y variables logísticas de procesamiento. Cada ensayo de irradiación constituyó tres tratamientos de dosis con rayos gamma (2.5, 5 y 7 Gy) y un basal (0 Gy) el cual se mantuvo bajo las mismas condiciones de transporte y conservación que las muestras expuestas al tratamiento. Por cada dosis se estableció tres réplicas del Ensayo Cometa ejecutadas en simultáneo.

Por ende, el número de irradiaciones y réplicas por muestras equivale a tres procedimientos independientes los cuales se han determinado teniendo en cuenta no solamente las limitaciones logísticas y económicas del tratamiento con irradiación si no también los antecedentes y estudios expuestos previamente (58,59).

Para la selección de participantes se tomaron en cuenta algunos criterios establecidos por la ICPMC (*International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens*) (60) indicados en los criterios de selección.

2.1.3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Muestras sanguíneas de personas mayores de 18 años y menores de 45 de cualquier sexo.
- Muestras sanguíneas de personas que brinden su consentimiento (**Anexo E**) para su participación.

2.1.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Muestras sanguíneas de personas con antecedentes de exposición a radiación ionizante.
- Muestras sanguíneas de personas con historial de consumo de tabaco.

2.1.4 VARIABLES.

2.1.4.1 Dosis de radiación ionizante

Es una variable cuantitativa de tipo continua, cuya escala de medición es de razón y presenta cuatro valores 0, 2.5, 5 y 7 Gy.

- a) Definición conceptual: Cantidad de energía cedida por la radiación a la materia irradiada por unidad de masa. Su unidad en el sistema internacional es el Gray (Gy) (J/Kg)
- b) Definición operacional: Cantidad de energía de radiación ionizante de baja LET (rayos gamma) absorbida por las células mononucleares de sangre periférica

2.1.4.2 Parámetros del ensayo cometa.

- a) Definición conceptual: Estimadores del daño al ADN por rotura de simple o doble cadena, que se realiza a través de la puntuación de los nucleoides mediante el uso de diferentes programas computarizados. Estos determinan la extensión del daño en base a la forma, el tamaño y densidad de ADN dentro

del "cometa" (47). El uso de un programa en particular proporciona variantes respecto a otros.

- b) Definición operacional: Incluye a los tres principales estimadores del daño al ADN (*Tail Intensity*, *Tail length*, *Olive tail moment*), medidos con un programa semiautomatizado (*Comet Assay IV*)
- c) Indicadores: Longitud de cola (*Tail length*) medida en micrometros, Porcentaje de ADN en cola (*Tail intensity*) y Momento de la cola (*Olive Tail moment*) sin unidades de medición.

2.1.5 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

2.1.5.1 Aislamiento y recuento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Procedimiento de separación de la mayor cantidad posible de linfocitos y monocitos (CMSP) de una matriz de sangre venosa total, sin afectar sus características morfológicas y funcionales. El método comúnmente empleado es la centrifugación en gradiente de densidades (descrito detalladamente en anexo). Luego se evalúa el rendimiento del aislamiento mediante recuento en cámara de Neubauer y cálculo del total de CMSP por microlitro de volumen de suspensión celular obtenido.

2.1.5.2 Ensayo de viabilidad de células mononucleares

Estimación de la proporción de CMSP vivas mediante pruebas indirectas de la actividad metabólica e integridad celular. El método empleado en este estudio se basa en la exclusión del colorante vital *Trypan blue*, como indicador de la capacidad impermeable de la membrana celular de las CMSP vivas. Para nuestros fines se considera como un indicador de calidad previo al ensayo cometa. Este paso es requisito para la continuidad del ensayo, se indica un mínimo del 90 % de viabilidad para ejecución del Ensayo Cometa. Porcentajes menores pueden sugerir daño por manipulación o alguna condición subyacente que podría sesgar los resultados del ensayo.

2.1.5.3 Irradiación

Procedimiento de inducción de daño genético (rupturas de simple u doble hebra de ADN) mediante suministro de dosis de radiación gamma (baja energía lineal de transferencia) homogénea. El estudio considera cuatro dosis de radiación (0, 2.5, 5 y 7 Gy) aplicadas con equipo de Teleterapia *Theratron Phoenix* (^{60}Co) en el Laboratorio secundario de calibraciones dosimétricas, centro de referencia nacional en calibración, dosimetría y estandarización de las radiaciones ionizantes (61)

2.1.5.4 Ensayo cometa alcalino

Referido también como Electroforesis en Gel de Células Individuales (*SCGE*). Es un método sensible y versátil para detección y estimación de rupturas de simple y doble cadena de ADN (daño genético) en células eucariotas. El método se basa en el tratamiento de lisis y electroforesis de linfocitos en condiciones alcalinas. La cuantificación se realiza por análisis de imágenes de los fragmentos libres que migraron fuera del nucleóide. Esta es una alternativa novedosa para evaluar daño genotóxico por diversos agentes (36).

2.1.5.5 Análisis de imágenes y reporte de resultados

El análisis de láminas fue realizado en el Laboratorio de Investigación de Efecto y Susceptibilidad (LIES) del Censopas-INS. Donde se encuentra el equipamiento sofisticado para la lectura y análisis de láminas, producto final del ensayo.

Cada lámina fue examinada a 200X de aumento con un microscopio de epifluorescencia (*Meiji MT 6000*) acoplado a una videocámara (*Allied Vision Stingray F046B IRF*) y un programa de análisis de imágenes (*Comet Assay IV; Perceptive Instrument*). Se obtuvo el recuento de la mayor cantidad posible de nucleoides al azar por cada minigel preparado los cuales fueron analizados para estimar los parámetros *Tail Intensity*, *Olive tail moment* y *Tail length*.

2.1.6 PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS

2.1.6.1 Selección de sujetos

La selección se realizó en base a los criterios establecidos cuya base de interés son las variables externas que puedan influir en el resultado. En ese sentido, algún historial de exposición a radiación u otro agente genotóxico conocido, que los participantes reportaran, fue considerado el principal motivo para su exclusión.

Se enrolaron seis participantes, tres varones y tres mujeres. El número de participantes y las réplicas de los ensayos se determinaron teniendo en cuenta las limitaciones logísticas y económicas del tratamiento con irradiación, así como las referencias de estudios relacionados.

2.1.6.2 Toma de muestra

Los participantes, previamente seleccionados e informados, tuvieron que ser transportados a primeras horas de la mañana, cada uno en diferente fecha coordinada, al centro nuclear Oscar Miroquesada de la Guerra (RACSO) del IPEN, ubicado en Huarangal, Lima. Se colectó la muestra en el Laboratorio de citogenética y radiobiología, lugar donde se ejecutaron los ensayos descritos.

Se mantuvieron las condiciones de bioseguridad y esterilidad para el procedimiento de flebotomía. La punción se realizó en la vena del antebrazo con una aguja *vacutainer* y un tubo al vacío heparinizado de 9 ml de capacidad. La muestra se envolvió y almacenó inmediatamente en refrigerador de 2 a 8 °C hasta que empiece el procesamiento (no más de 30 minutos). De este modo reducimos el metabolismo basal fisiológico y evitamos algún efecto mecánico, térmico o genotóxico de la exposición a la luz.

2.1.6.3 Aislamiento, recuento y viabilidad de células mononucleares de sangre (CMSP)

El aislamiento de CMSP se realizó mediante gradiente de densidad por centrifugación con el medio separador, Histopaque 1070, según el protocolo del fabricante *Sigma* (**Anexo C**). Brevemente, se dispensó tres mililitros de histopaque

en un tubo cónico de 15 ml, sobre el cual se agregó, lentamente y en zona, igual volumen de sangre total. Se centrifugó a 750 g por 30 minutos, luego de la cual se obtuvo la interface de CMSP. Esta zona fue aspirada con micropipeta y colectada en otro tubo para realizar un lavado con RPMI.

La evaluación de la viabilidad celular se realizó mediante observación microscópica y conteo de las células capaces de excluir el colorante vital *Trypan Blue* (0.4 %). Ello es indicador de la integridad de membrana celular y se expresa en porcentaje de células no coloreadas sobre el total. El procedimiento de la casa comercial (Gibco) indica mezcla de volúmenes proporcionales de la suspensión celular y el colorante. Incubación a temperatura ambiente por un máximo de cinco minutos y evaluación.

El recuento de CMSP se realizó por duplicado en cámara de Neuvauer con la suspensión diluida al medio con solución de Turk. Con el fin de evitar sobreestimación de recuento por la confusión con eritrocitos. Se consideró un valor óptimo de 3000 a 5000 células por microlitro de la suspensión. Dicho valor es referencial puesto que en base la experiencia, a dosis de radiación altas se debe considerar un número menor de células por volumen, debido que hay más probabilidad de superposición de células con daño inducido.

Alcanzados los parámetros de calidad establecidos para ejecutar el ensayo, más del 95% de viabilidad y promedio de 4000 células por microlitro. Procedimos a alicuotar la suspensión celular en cuatro tubos *eppendorf* de polietileno de dos mililitros de capacidad. Una para cada dosis de irradiación, el volumen puede variar de 100 a 200 microlitros por vial dependiendo el rendimiento del aislamiento.

2.1.6.4 Diseño del estudio con el Ensayo Cometa.

El diseño del estudio *in vitro* con el ensayo cometa sigue una estructura de naturaleza “jerárquica y anidada” (62). El modelo se describe desde el producto, las láminas, en el cual se encuentran “anidadas” las células mononucleares. Dichas células se aislaron de una muestra biológica y se sometieron (“anidaron”) a diversos tratamientos (dosis de irradiación). Estas células, con daño inducido, se consideran las unidades de experimentación.

En este estudio se consideró la participación de seis individuos aparentemente sanos, tres de cada sexo, a quienes se les extrajo una muestra sanguínea. Se aislaron CMSP por cada muestra y se alicuotaron sendos volúmenes de suspensión celular en cuatro tubos *ependorf*. Por lo tanto, se obtuvieron cuatro volúmenes de suspensión celular equitativamente repartidos por cada participante. Se dispusieron los cuatro tubos aleatoriamente para ser tratadas con una de las cuatro dosis de radiación (0, 2.5, 5 o 7 Gy) establecidas.

Posteriormente, se elaboraron las láminas para el ensayo, por triplicado, correspondiente a cada dosis de tratamiento. El formato empleado establece la disposición de dos minigeles por cada lamina. Cada minigel de agarosa es el embebido de CMSP tratadas.

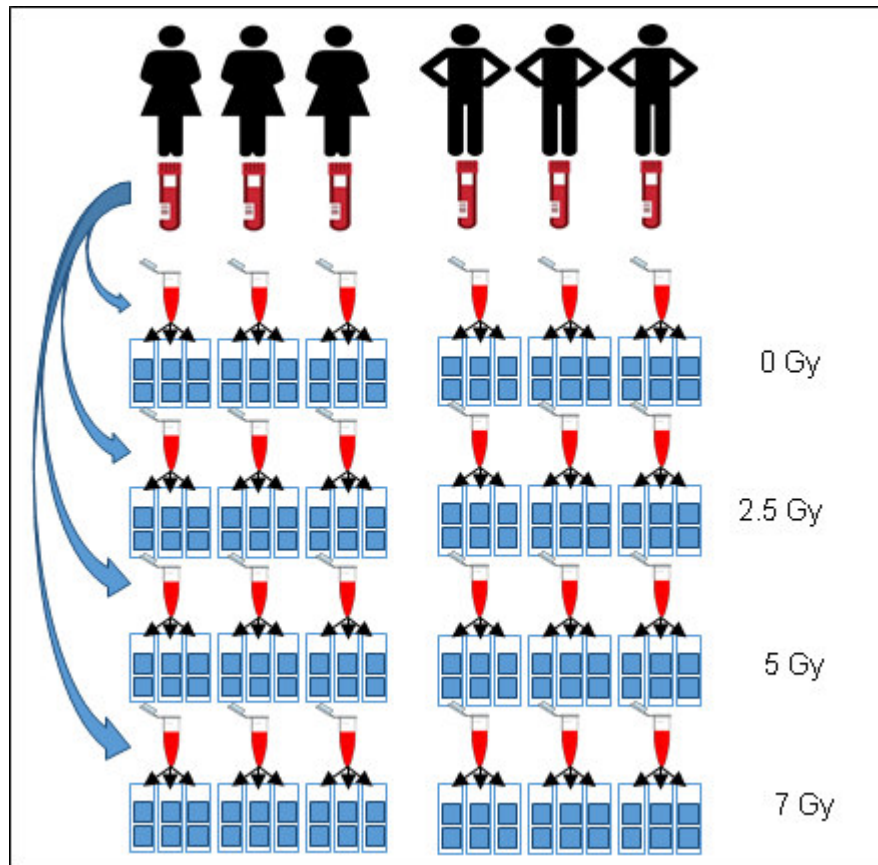


Figura n °.4 Esquema del diseño de estudio para ejecución del ensayo cometa. Se aíslan CMSP por cada una de las seis muestras de sangre. Se distribuyen en cuatro tubos correspondientes a cada dosis y finalmente por cada tubo irradiado se elaboran tres láminas.

2.1.6.5 Irradiación gamma

La irradiación de las muestras se realizó en el Laboratorio Secundario de Calibraciones Dosimétricas del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN), laboratorio de referencia nacional en calibración y estandarización de las radiaciones ionizantes y único centro en nuestro país que sostiene la trazabilidad con patrones primarios OIEA. Se dispuso del equipo de Teleterapia *Theratron Phoenix*, en cuyo sistema se aloja el isótopo radiactivo sintético de cobalto, Co-60, como fuente de emisión de energía de baja LET (rayos gamma)

Se suministraron las dosis de radiación establecidas (0, 2.5, 5 y 7 Gy) en base a la tasa de dosis emitida por el equipo durante un tiempo calculado para que se alcance el nivel de exposición deseado (Tabla n° 3). Antes y después de la irradiación se mantuvieron los tubos con la suspensión celular protegidos de la luz y en cadena de frío (2 a 8 °C). Con ello prevenimos algún deterioro de las células o eventual reparación del ADN no deseado.

Los cálculos para la tasa de dosis toman en cuenta el periodo de semidesintegración del radioisótopo (5.27 años) y la distancia de ubicación de la muestra con respecto a la fuente. Los físicos encargados del equipo establecieron, para todos los casos, una ubicación isocéntrica de 80 cm (figura n° 5) con respecto a la fuente. Para los ensayos ejecutados a intervalos de tiempo muy distante (aproximadamente un mes) se debe recalcular los tiempos de exposición, puesto que el decaimiento radiactivo ya es significativo y la tasa de dosis ya disminuyó.

Tabla n °.3 Tiempos de irradiación calculados por cada dosis de radiación en dos etapas del estudio,

Dosis (mGy)	Tiempo (segundos)	
	Etapas 1 Irradiación 1, 2 y 3	Etapas 2 Irradiación 4, 5 y 6
0	0	0
2 500	381	393
5 000	762	785
7 000	1067	1099

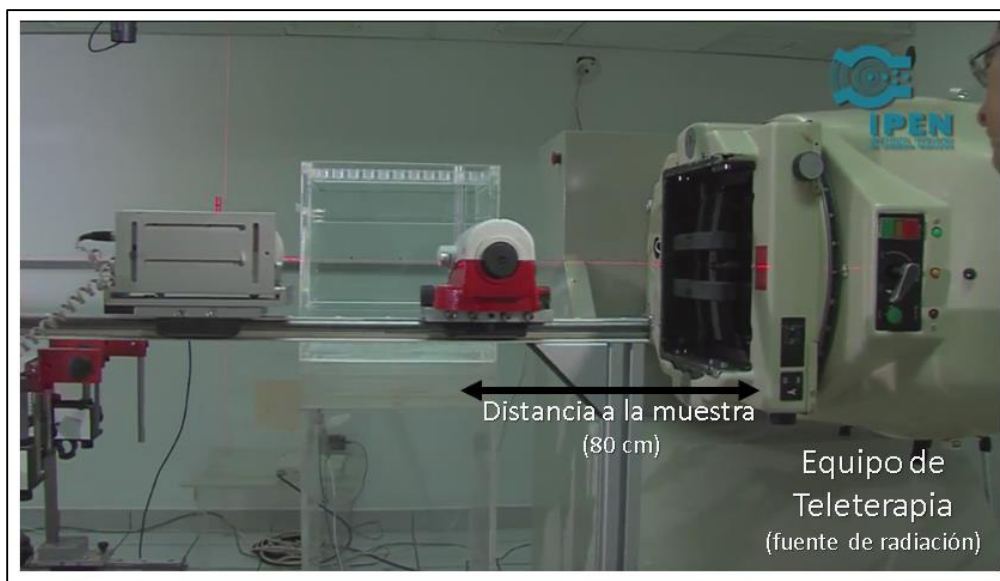


Figura n °.5 Disposición de la fuente de irradiación, equipo de Teleterapia. El lugar donde se coloca el tubo con la suspensión celular, a 80 centímetros del equipo.

Adicionalmente se consideraron otros parámetros físicos para garantizar la homogeneidad de la irradiación, como el diámetro, grosor y tipo de material del tubo contenedor de la suspensión celular. En base a las dimensiones del tubo contenedor que seleccionamos, se confeccionó un soporte de tecnopor acorde a las dimensiones. También se incorporó una lámina de acrílico “virgen” (100% puro) de 3 mm, a una distancia adecuada entre la fuente y la muestra para alcanzar el llamado “equilibrio electrónico”, zona “*build-up*”. Así la suspensión celular será el punto de mayor dosis y homogeneidad.

2.1.6.6 Ensayo Cometa Alcalino

El ensayo cometa alcalino se ha ejecutado en base al protocolo del Censopas PRT-00X, con algunas modificaciones tomadas de las recomendaciones publicadas por la ECVAG (27). Inicialmente se tenía previsto al laboratorio LIES del Censopas-INS, como punto de ejecución de los ensayos postirradiación, puesto que está especialmente acondicionado para tales actividades de investigación. Sin embargo, debido a la lejanía y los problemas de transporte y que implicaban movilizar las muestras irradiadas tuvimos que adaptamos a las condiciones de infraestructura, insumos y equipamiento disponibles en el Laboratorio de Citogenética y

Radiobiología del IPEN, lugar donde se ejecutó el procesamiento total de muestras para el ensayo cometa.

La verificación del método se basó en la ejecución de sucesivos ensayos con muestras “control” provenientes de sujetos sin exposición. Para la valoración de la calidad del ensayo se toman criterios de expertos en la materia ante la falta de células control estándar. El protocolo detallado se describe en **Anexos**. El producto final (laminas) fueron transportadas previa deshidratación al laboratorio del Censopas para su respectivo análisis por microscopia de epifluorescencia.

2.1.6.7 Análisis de imágenes

La lectura de láminas fue realizada por el tesista, quien estuvo entrenado en el manejo del programa de medición de parámetros, *Comet Assay IV*. Se asignó un código provisional a cada lámina para enmascarar al evaluador respecto a las dosis de tratamiento correspondiente. Ello con el fin de evitar el sesgo de selección de nucleoides al cual podría estar asociado a la subjetividad del analista.

Se consideró un recuento mínimo de 100 nucleoides por lamina (50 nucleoides por gel), cantidad establecida convencionalmente para el análisis de láminas con el ensayo cometa. Así mismo se adoptó un sistema predeterminado de muestreo aleatorio para recuento de nucleoides basado en probabilidad de selección (63).

Para los criterios de recuento consideramos las indicaciones del *Atlas of Comet Assay images* (85). El cual admite la incorporación para el recuento de todo nucleoide, excepto, aquellos que pudieran sesgar la medición de resultados, como los siguientes:

- Nucleoides que se encuentren al borde del gel (*Edge effects*) (32).
- Nucleoides “*gosht*”, “*cloud*” o “*hedgehog*” que son células cuya morfología ha sido alterada por el proceso de apoptosis (64).
- Nucleoides pobremente teñidos, con un núcleo atípicamente dañado o que se sobrelapen entre ellos.

- Nucleoides cuyo tamaño fuese considerablemente grande o polimorfo, característicos de monocitos grandes y neutrófilos, respectivamente.

También aquellos que dificulten la adecuada medición de los parámetros como aquellos productos de artefactos de lámina, geles, alrededor de burbujas de aire u otros.

2.1.6.8 Análisis estadístico

Se elaboró una base de datos en Excel con las variables de interés en cada columna y las unidades de recuento (nucleoides) en las filas. El diseño de análisis estadístico para el ensayo cometa se basa en un modelo “jerarquizado” en donde las células aisladas que derivan de una muestra sanguínea se encuentran embebidas en minigeles, los cuales integran una lámina.

Las variables numéricas se describieron con medias y medianas como medidas de tendencia central y desviación estándar y rango intercuartílico para la dispersión. A pesar de que la variable no muestre distribución normal, sobre todo a dosis bajas de radiación, se empleó de estadística paramétrica (65).

Se aplicó pruebas de correlación y regresión lineal entre los parámetros de daño y dosis de radiación para cada muestra. Para la prueba de significancia entre pendientes de curva se empleó la prueba F. El análisis para evaluar los resultados se realizó con el manejo del paquete estadístico STATA versión 12 y la construcción y análisis de curvas con el programa *GrahPad Prism 7*.

2.1.7 CONSIDERACIONES ÉTICAS

La realización del presente estudio no involucró riesgo a la salud de los participantes, excepto por las posibles molestias durante o después de la toma de muestra sanguínea.

La confidencialidad de la información proporcionada y los resultados fueron manejados únicamente por el autor de la investigación. Todas estas consideraciones fueron conocidas al detalle y aceptadas por los participantes a través del consentimiento informado (**ver Anexo**).

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3 RESULTADOS

El estudio se enfocó en evaluar la relación dosis-respuesta usando el Ensayo Cometa en un modelo *in vitro* de daño genético inducido con radiación ionizante. De acuerdo al diseño de la investigación se evaluaron tres parámetros (*Tail intensity*, *Tail length* y *Tail moment*) como indicadores de daño genotóxico, por cada uno de los seis ensayos de irradiación realizados.

3.1 Recuento y viabilidad celular.

El aislamiento y evaluación de la viabilidad se realizaron de acuerdo a los protocolos estipulados (anexos). La tabla n°. 4 se muestra el recuento de CMSP en cámara de Neubauer y cálculo de las concentraciones por microlitro y por volumen total de suspensión celular. El volumen se ajustó, en todos los casos, a 800 µl para que pueda repartirse equitativamente 200 µl por cada dosis de irradiación. La cantidad colectada de CMSP fue apropiada para la ejecución del ensayo (3000 a 5000 células/µl). Así mismo, el porcentaje de viabilidad celular fue consistentemente superior al 95 %. Por consiguiente, en todos los casos se consideran aceptables las condiciones previas necesarias para la ejecución del ensayo cometa alcalino.

Tabla n °.4 Recuento y viabilidad celular de CMSP, por cada ensayo de irradiación.

	Promedio de recuento en cámara Neubauer	Concentración de células/µl*	Total de células aisladas (volumen final de 800 µl)	% Viabilidad (Trypan blue)
Ensayo 1	276.5	5 530	4 424 000	98
Ensayo 2	311	6 220	4 976 000	99
Ensayo 3	251.25	5 025	4 020 000	98
Ensayo 4	245.5	4 910	3 928 000	99
Ensayo 5	284.25	5 685	4 548 000	99
Ensayo 6	352.5	7 050	5 640 000	98

*Se obtiene con el promedio del recuento en cámara, multiplicado por 20 (factor de dilución y dimensiones de la cámara)

3.2 Análisis de resultados del ensayo cometa alcalino.

Los resultados del ensayo cometa se evalúan individualmente por cada uno de los parámetros en cuestión y en función a las dosis de tratamiento. El recuento de nucleoides estuvo limitado a los criterios de aceptación establecidos. Como se aprecia en la tabla n°.5, se colectó suficiente cantidad de nucleoides, conforme a lo establecido como requerimiento mínimo, 300 nucleoides por dosis de radiación, a excepción de un punto de dosis (2.5 Gy) en el caso 6, en el que se contó 265, debido problemas técnicos ajenos a la pericia del evaluador.

Tabla n °.5 Numero de nucleoides colectados por las tres laminas correspondientes a una dosis de tratamiento.

Casos	Dosis (Gy)			
	0	2.5	5	7
1 ♂	303	568	421	356
2 ♂	450	755	732	468
3 ♀	601	609	608	566
4 ♂	400	607	513	430
5 ♀	400	500	400	401
6 ♀	300	265	307	306

La primera imagen (figura n°. 6) muestra una fotografía que reúne a los nucleoides (cometas) representativos por cada dosis de irradiación. Se aprecia el cambio morfológico producto del incremento del daño. El cual se expresa, principalmente, en la elongación de las “colas” y por consiguiente la reducción de la “cabeza” (núcleo). El programa de análisis de imágenes define los límites y la intensidad luminosa. En base a ello se extraen los valores de los tres parámetros.

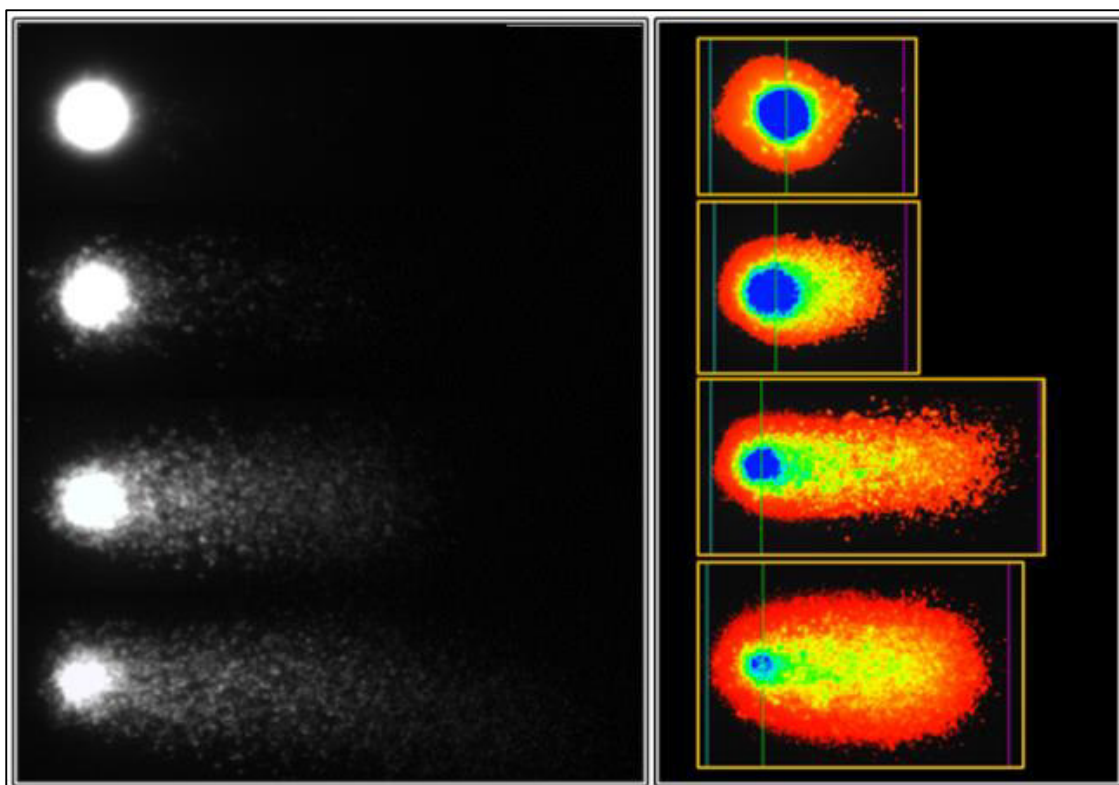


Figura n °.6 Las imágenes de la apariencia de los “cometas” por cada dosis de irradiación (0, 2.5, 5 y 7 Gy). Captada por la videocámara en escala de grises (izquierda) y convertida, al formato digital con el software Comet Assay IV (derecha).

3.2.1 *Tail Intensity* (TI)

Analizamos, en primer lugar, el parámetro *Tail Intensity* (TI). En la tabla n °. 6, observamos los resultados por cada caso de irradiación. El análisis descriptivo se presenta por medidas de tendencia central, dispersión y distribución. Como prueba de normalidad se empleó Shapiro Wilks.

Tabla n °.6 Estadística descriptiva de los valores del parámetro *Tail Intensity* por dosis de radiación ionizante, subdividido por caso.

Caso	Dosis	Media	D.S	Mediana	RIQ	Curtosis	Skewness	Shapiro Wilk (p)
1 ♂	0	1.3	1.75	0.66	1.68	9.47	2.4	<0.001
	2.5	17.66	7.85	16.21	11.36	3.38	0.78	<0.001
	5	45.47	9.29	45.42	12.92	2.69	0.06	0.706
	7	62.98	8.21	63.42	11.76	2.75	-0.13	0.415
2 ♂	0	0.71	1.24	0.1	0.88	9.54	2.43	<0.001
	2.5	9.08	5.91	7.68	8.63	3.27	0.85	<0.001
	5	26.85	9.11	25.6	13.58	2.64	0.46	<0.001
	7	33.31	9.8	31.76	13.09	2.85	0.62	<0.001
3 ♀	0	0.44	0.93	0.07	0.39	37.43	4.44	<0.001
	2.5	12.19	5.59	11.45	7.35	3.88	0.8	<0.001
	5	36.72	7.95	36.51	10.64	2.87	0.15	0.255
	7	57.29	8.86	57.71	11.81	3.11	-0.2	0.069
4 ♂	0	1.43	2.04	0.59	1.71	20.75	3.26	<0.001
	2.5	9.76	5.43	8.55	6.03	6.18	1.54	<0.001
	5	29.28	8.13	28.46	10.83	3.57	0.68	<0.001
	7	40.21	7.18	39.51	10.01	2.72	0.27	0.010
5 ♀	0	1.14	1.32	0.7	1.42	11.19	2.37	<0.001
	2.5	12.66	5.53	11.82	6.7	3.66	0.8	<0.001
	5	29.65	8.08	28.88	11.33	3.09	0.45	<0.001
	7	50.8	7.4	50.97	10.06	3.11	-0.2	0.390
6 ♀	0	0.86	0.94	0.5	1.28	4.6	1.4	<0.001
	2.5	8.95	4.41	8.55	5.87	4.02	0.89	<0.001
	5	22.93	6.32	22.46	8.44	3.38	0.5	0.002
	7	36.52	7.62	36.29	10.07	2.9	0.25	0.144

N: Numero de nucleoides analizados

RIQ: Rango Intercuartílico

En relación a la estadística descriptiva. Los parámetros estadísticos de tendencia central (media y mediana) expresan valores similares, con ligera sobrestimación de la media. Ello producto de la asimetría en la distribución de datos, particularmente acentuado en los niveles de baja irradiación (0 y 2.5 Gy).

En cuanto a las medidas de dispersión, la desviación estándar (D.E.) y el rango intercuartílico (RIQ) tienden a incrementarse a medida que aumenta el daño inducido (dosis de radiación). Como se observa en el histograma de distribución (figura n° 7), los nucleoides con daño basal, dosis 0 Gy, concentran la mayoría de los datos en torno a un valor cercano al cero (ausencia de daño), con sesgo (Skewness) positivo marcado y curtosis prominente.

En consecuencia, estos puntos de dosis (0 y 2.5) no se ajustan al modelo de distribución normal, Shapiro-Wilk ($p < 0.05$). Por el contrario, a dosis altas (5 y 7 Gy) el gráfico se adecua más a una forma acampanada plana y simétrica. Así mismo en el gráfico de cajas (figura n° 8) notamos la ausencia de datos aberrantes en el punto de mayor dosis en la cual se establecen mejor distribuidos los datos.

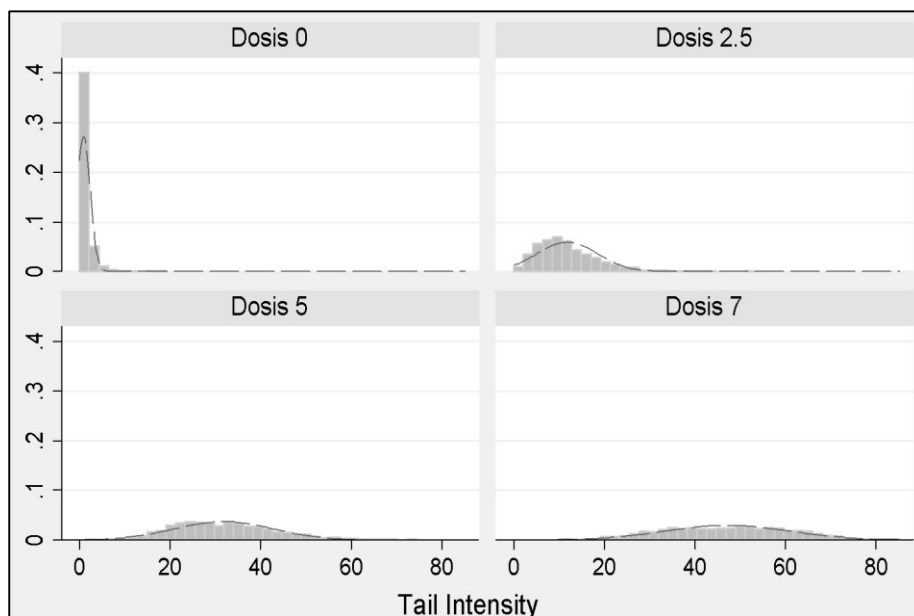


Figura n °.7 Histograma global de distribución de todos los valores del parámetro *Tail Intensity* por cada dosis de radiación (0, 2.5, 5 y 7 Gy).

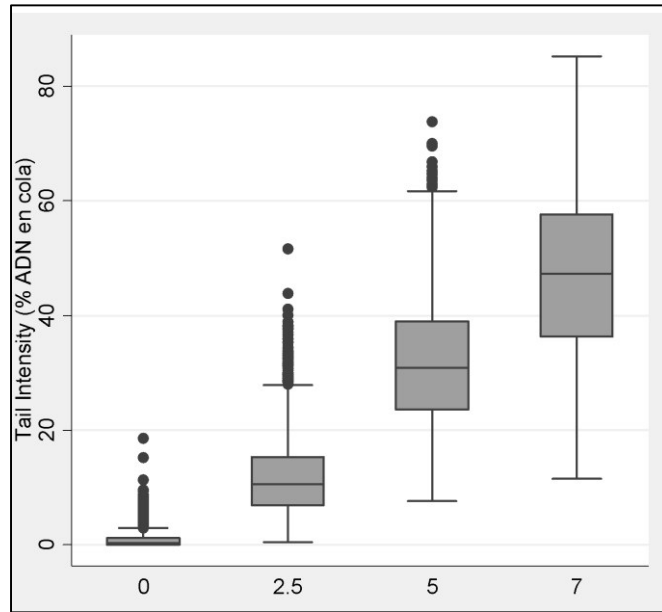
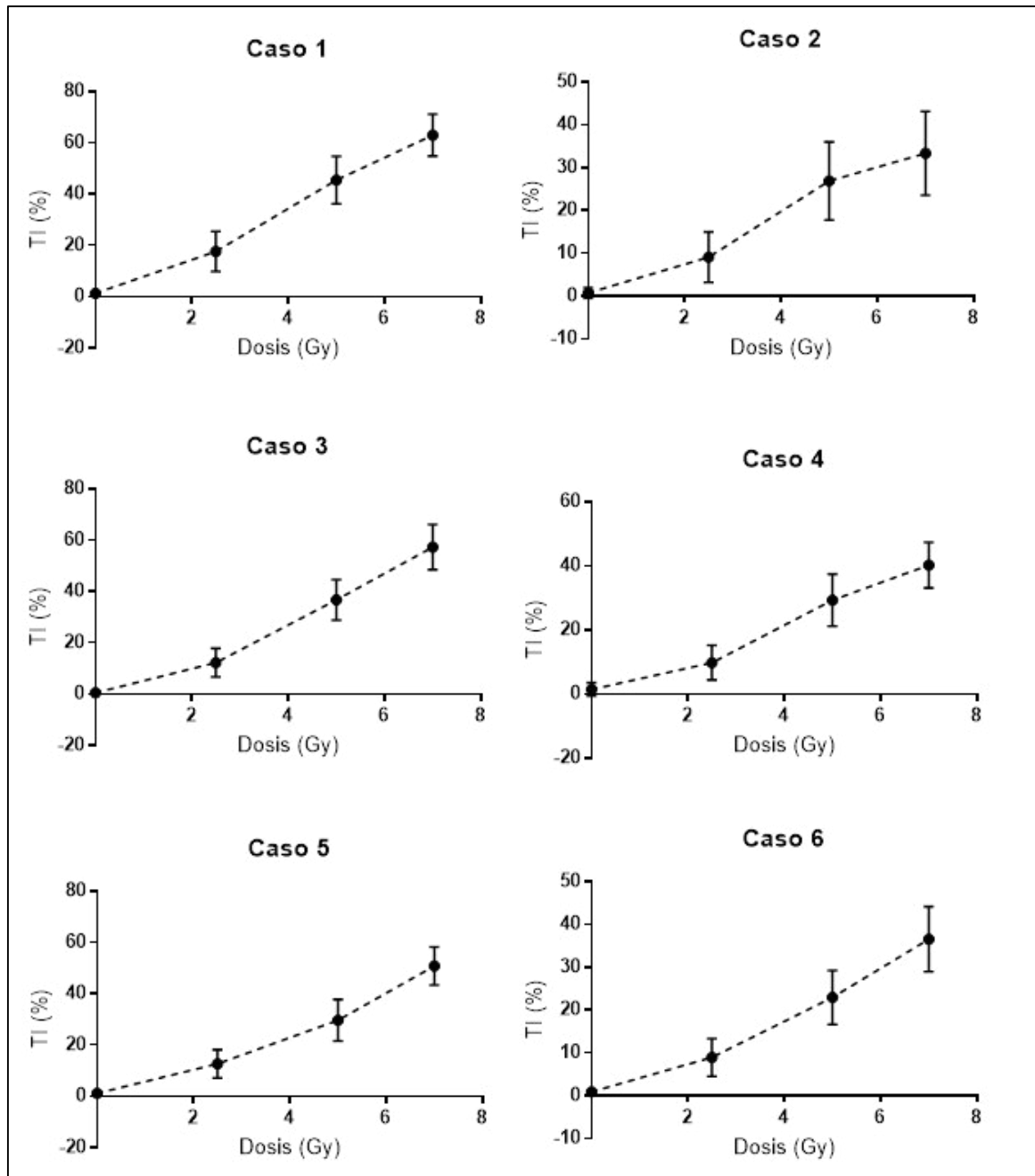


Figura n °.8 Diagrama general de cajas y bigotes para los valores del parámetro *Tail Intensity* por cada dosis de radiación (0, 2.5, 5 y 7 Gy).

3.2.1.1 Relación dosis-efecto con el parámetro *Tail Intensity*

Se construyeron seis gráficos individuales dosis efecto (figura n °.9). Para la construcción de las curvas se consideraron los valores de las medias, desviación estándar y el número de nucleoides colectados, por cada caso. Con estos datos se establecieron los puntos de curva y el error estándar asociado a este valor. Se aplicó estadística paramétrica a pesar de contar con algunos datos producto de distribución no normal. Ello debido a la similitud en los valores de las medias y medianas, así como el respaldo de reportes que avalan su uso para evaluaciones de magnitud de efecto (65).

Como se observa, en cada curva individual existe una clara aproximación de relación lineal dependiente entre las dosis de radiación (Gy) y el nivel de daño en el ADN (expresado con el TI). No obstante, también se advierte ciertas diferencias entre casos cuyos valores difieren al verificar las mismas dosis. Para distinguir entre estas variaciones, se muestra en la figura n°. 10, la agrupación de todas las curvas en un mismo plano. En la cual se aprecia la divergencia de las curvas, que es más evidente a medida que se incrementan las dosis de radiación.



TI (%): Tail Intensity

Figura n °.9 Curvas individuales dosis-efecto mediante el ensayo del cometa. Daño en el ADN (TI) inducido por irradiación gamma en un rango de 0 a 7 Gy

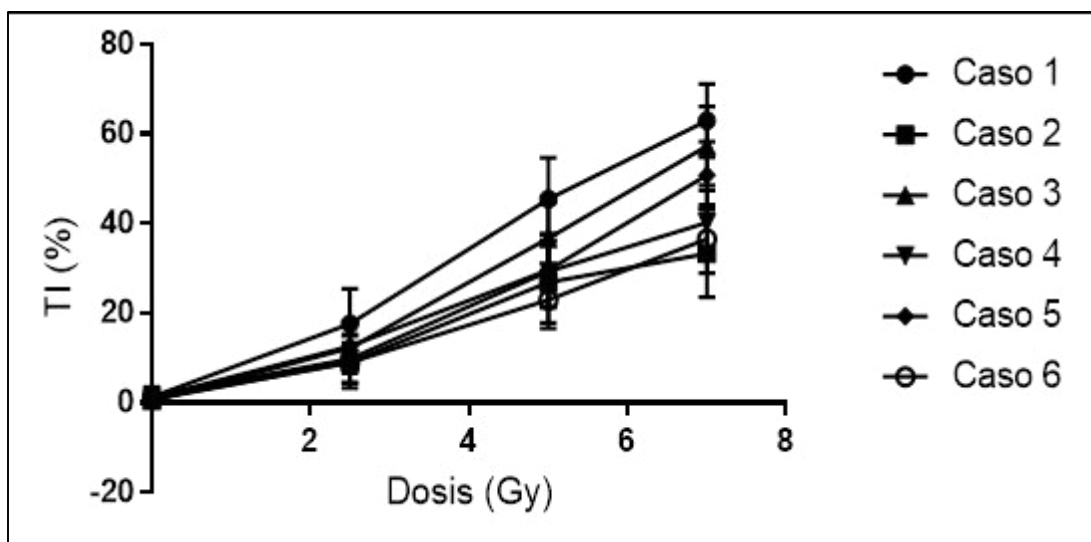


Figura n.º 10 Total de curvas dosis-efecto con el parámetro *Tail intensity* bajo un mismo plano. Daño en el ADN (TI) inducido por irradiación gamma en un rango de 0 a 7 Gy

En base al análisis de regresión lineal se obtuvieron los coeficientes de correlación de Pearson, pendientes y las ecuaciones de curva (tabla n.º 7). De los resultados observamos muy buena correlación lineal (r) y significativa ($p < 0.05$) para todos los casos, así como buen ajuste al modelo de regresión lineal, R^2 promedio = 0.9885, SD = 0.004. Las pendientes de curva, interpretado como el daño estimado en TI producido por 1 Gray de irradiación gamma, muestran variabilidad (CV = 25.48 %) y diferencia significativa ($p = 0.0068$, prueba F) entre ellas.

Tabla n.º 7 Coeficientes de correlación y regresión lineal de las curvas dosis efecto con el parámetro *Tail Intensity* por cada caso.

	r	R^2	P (bilateral)	Pendiente \pm ES	Ecuación de curva
Caso 1	0.995	0.99	0.005	9.047 ± 0.6429	$Y = 9.047 * X - 0.9442$
Caso 2	0.9878	0.9758	0.0122	4.932 ± 0.5496	$Y = 4.932 * X - 0.3905$
Caso 3	0.987	0.9742	0.013	8.254 ± 0.9495	$Y = 8.254 * X - 3.261$
Caso 4	0.9884	0.9769	0.0116	5.772 ± 0.6274	$Y = 5.772 * X - 0.7526$
Caso 5	0.9844	0.969	0.0156	7.001 ± 0.8858	$Y = 7.001 * X - 1.817$
Caso 6	0.9885	0.9771	0.0115	5.114 ± 0.5533	$Y = 5.114 * X - 1.224$

3.2.2 Tail lenght (TL)

En relación al parámetro *Tail lenght* (TL) se muestra la tabla de análisis descriptiva (tabla n° 8), donde se aprecian las medidas de resumen preestablecidas (central, dispersión y distribución). La primera observación es en relación a la presencia de “colas” con longitudes considerables en la categoría de daño basal (dosis 0, sin irradiación). En particular, el caso 1 que supera a todos los demás.

Tabla n °.8 Estadística descriptiva de los valores del parámetro *Tail lenght* por dosis de radiación ionizante, subdividido por caso.

Caso	Dosis	Media	DS	Mediana	RIQ	Curtosis	Skewness	Shapiro-Wilk (p)
1 ♂	0	62.72	16.87	64.1	17.95	3.28	-0.03	0.017
	2.5	94.29	12.81	95.9	15.38	3.67	-0.73	<0.001
	5	118.04	10.09	119.49	12.82	4.31	-0.37	<0.001
	7	120.47	13.68	117.95	9.74	8.6	2.15	<0.001
2 ♂	0	37.62	14.23	34.87	21.54	2.68	0.67	<0.001
	2.5	57.86	12.34	59.49	15.9	3.2	-0.35	<0.001
	5	73.18	8.83	73.85	11.79	3.26	-0.15	0.055
	7	76.04	8.09	75.9	11.54	3.4	-0.01	<0.001
3 ♀	0	30.88	11.3	28.21	18.97	3.17	0.75	<0.001
	2.5	96.96	27.5	94.36	44.62	2.09	0.1	<0.001
	5	124.87	18.63	120	30.77	2.2	0.41	<0.001
	7	145.07	21.68	146.15	35.38	2.03	0.1	<0.001
4 ♂	0	53.27	16.98	51.28	17.95	3.08	0.63	<0.001
	2.5	94.85	12.19	95.38	16.41	3.19	-0.45	<0.001
	5	99.8	7.76	100.51	9.74	5.01	-0.27	<0.001
	7	103.73	8.77	102.56	10.26	9.4	1.09	<0.001
5 ♀	0	48.39	14.36	46.15	16.92	5.82	1.26	<0.001
	2.5	84.13	16.72	85.64	23.59	2.42	-0.14	0.001
	5	95.32	17.74	94.87	27.95	2.2	0.29	<0.001
	7	134.43	10.39	134.87	12.31	6.26	-0.14	<0.001
6 ♀	0	34.02	8.61	34.36	13.85	2.61	0.18	0.020
	2.5	53.16	12.01	52.31	17.44	2.67	0.28	0.065
	5	72.03	9.72	72.31	12.31	6.14	0.55	<0.001
	7	82.08	8.18	82.56	8.72	3.88	-0.18	<0.001

Otra diferencia en comparación con el *Tail Intensity*, es el sesgo (*skewness*), que tiende más a la asimetría (cero). Sin embargo, la distribución muestra un patrón desordenado con picos irregulares el cual no se ajusta a una campana gaussiana (histograma, figura n° 11). En consecuencia, la prueba de normalidad indica distribución no normal en la mayoría de los casos ($p < 0.005$). Por otro lado, los parámetros de dispersión (DS, RIQ) se mantienen con ligera tendencia al decrecimiento en función del incremento de dosis.

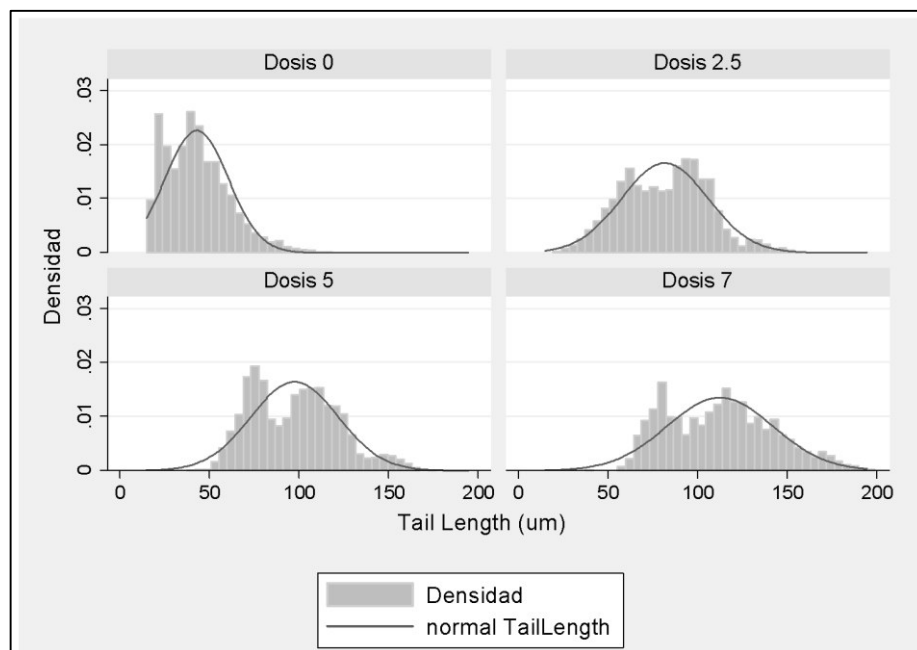


Figura n °.11 Histograma global de distribución de todos los valores del parámetro *Tail length* y por cada dosis de radiación (0, 2.5, 5 y 7 Gy).

Un aspecto resaltante de los valores de la tabla es que los valores de las medidas de tendencia central para los dos puntos de mayor dosis (5 y 7 Gy), no distan mucho entre sí. En particular en el caso 1 que presenta no diferencia significativa ($p = 0.0546$, U de Mann Whitney). Ello se evidencia mejor en el gráfico de cajas (figura n°. 12) que muestra el decaimiento general en el comportamiento lineal de la relación dosis-efecto para todos los casos. La longitud de cola llega a su punto de saturación máxima a la dosis de 7 Gy limitando el incremento de su extensión horizontal.

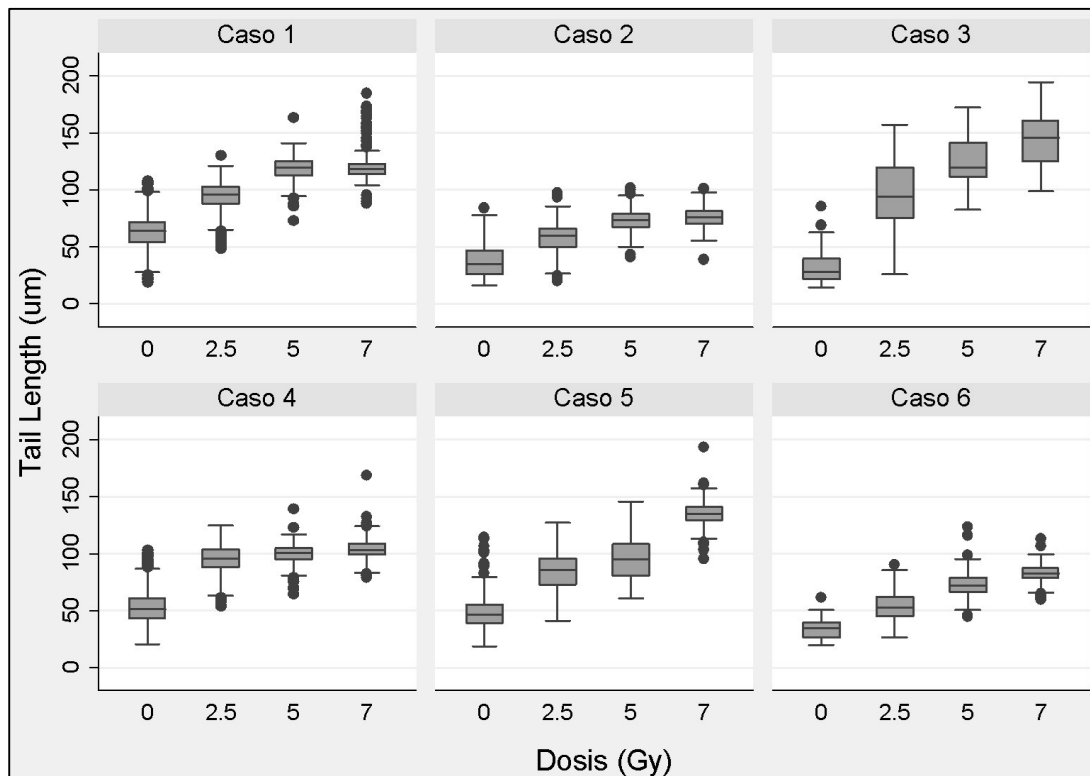


Figura n °.12 Diagrama de cajas y bigotes para los valores del parámetro *Tail length* por cada caso y dosis de radiación (0, 2.5, 5 y 7 Gy).

3.2.2.1 Relación dosis-efecto con el parámetro *Tail Lenght (TL)*

El análisis de regresión se utilizó para estimar los parámetros del ajuste lineal de los datos. Se emplearon los valores de las medias, D.S. y el número de nucleoides para la construcción de las curvas (Figura n°. 13). Los resultados, como se muestra en la Tabla n° 11, indican que existe una buena correlación positiva entre las dosis y los valores del *Tail length* (Pearson), R^2 prom. = 0.959, D.E.: 0.04. La correlación es significativa ($p < 0.05$), excepto para el caso 4 ($p = 0.12$).

Las diferencias en las pendientes muestran que son significativas ($F = 4.027$, $p = 0.0223$). En promedio el daño estimado por unidad de dosis incrementara en 9.19, DE: 3.83 micrómetros en la longitud de la cola. Sin embargo, el rango de variación es amplio

Tabla n °.9 Coeficientes de correlación y regresión lineal de las curvas dosis efecto con el parámetro *Tail length* por cada caso.

	r	R²	P (bilateral)	Pendiente ± ES	Ecuación de curva
Caso 1	0.9624	0.9262	0.037	8,504 ± 1,697	Y = 8,504*X + 68,05
Caso 2	0.9704	0.9417	0.030	5,627 ± 0,9902	Y = 5,627*X + 40,78
Caso 3	0.9704	0.9416	0.030	15,9 ± 2,799	Y = 15,9*X + 41,8
Caso 4	0.88	0.7744	0.120	6,772 ± 2,585	Y = 6,772*X + 63,36
Caso 5	0.9745	0.9496	0.026	11,37 ± 1,851	Y = 11,37*X + 49,36
Caso 6	0.9966	0.9932	0.003	6,968 ± 0,4068	Y = 6,968*X + 35,06

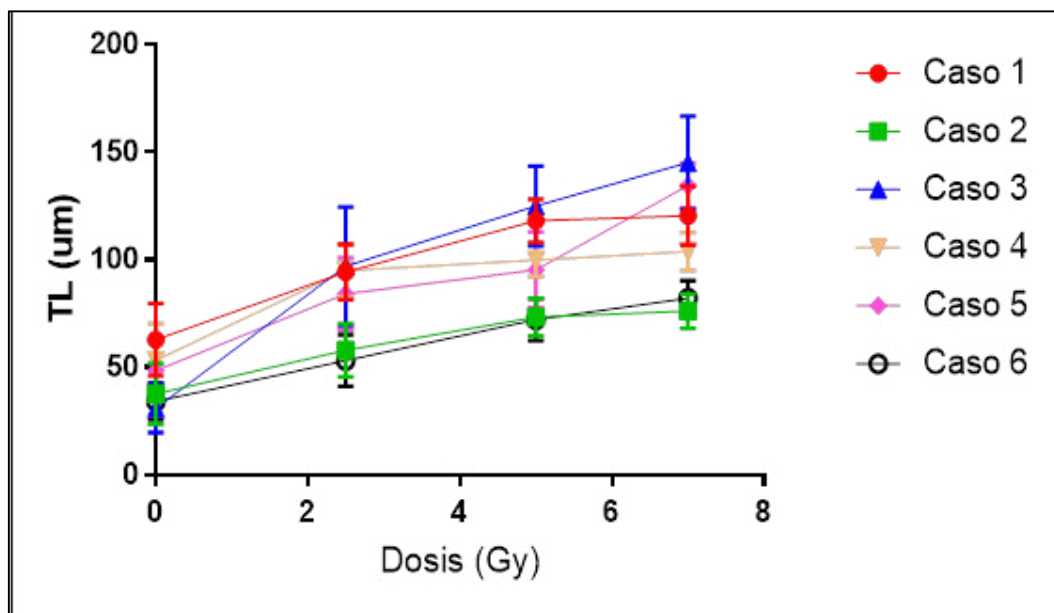


Figura n °.13 Total de curvas dosis-efecto con el parámetro *Tail length* y dosis de irradiación gamma (0, 2.5, 5 y 7 Gy)

3.2.3 Olive Tail moment (OTM)

Los resultados del parámetro OTM se resumen en la Tabla n°. 10. Se muestran los valores medios (media y mediana) asociados a los de dispersión y distribución por grupos de dosis. El comportamiento de los datos se asemeja al patrón observado con el *Tail Intensity*.

Tabla n °.10 Estadística descriptiva de los valores del parámetro *Olive Tail moment* por dosis de radiación ionizante, subdividido por caso.

Caso	Dosis	Media	D.S	mediana	RIQ	Curtosis	Skewness	Shapiro-Wilk (p)
1 ♂	0	0.35	0.47	0.14	0.38	15.39	3.05	<0.001
	2.5	4.71	1.95	4.33	2.36	7.74	1.51	<0.001
	5	19.14	4.64	18.71	6.12	3.25	0.51	<0.001
	7	27.84	4.63	28.03	6.28	3.02	0.02	0.690
2 ♂	0	0.14	0.27	0.02	0.16	17.64	3.42	<0.001
	2.5	1.82	1.18	1.62	1.34	5.92	1.44	<0.001
	5	6.79	2.05	6.53	2.81	3.46	0.6	<0.001
	7	9.03	2.59	8.58	3.68	3.32	0.69	<0.001
3 ♀	0	0.07	0.16	0.01	0.07	48.69	5.41	<0.001
	2.5	3.47	2.1	2.91	2.59	4.8	1.27	<0.001
	5	14.24	5.1	13.38	7.07	3.2	0.61	<0.001
	7	28.52	8.4	28.26	11.8	2.71	0.35	<0.001
4 ♂	0	0.35	0.63	0.11	0.36	35.46	4.58	<0.001
	2.5	2.98	1.85	2.5	1.8	8.91	2.04	<0.001
	5	9.48	3.1	9.01	3.88	4.06	0.86	<0.001
	7	13.81	3.19	13.39	4.54	3.1	0.5	<0.001
5 ♀	0	0.23	0.28	0.15	0.26	16.19	3	<0.001
	2.5	3.33	1.75	2.93	2.07	6.2	1.39	<0.001
	5	9.05	3.87	8.27	5.33	3.72	0.9	<0.001
	7	22.13	4.83	22.07	6.01	3.12	0.06	0.290
6 ♀	0	0.14	0.16	0.09	0.2	4.85	1.51	<0.001
	2.5	1.66	0.94	1.45	0.98	9.61	2.03	<0.001
	5	5.68	1.97	5.48	2.76	4.13	0.79	<0.001
	7	10.52	2.67	10.24	3.44	3.18	0.51	<0.001

Los valores representativos del daño basal (0 dosis) se encuentran estrechamente concentrados en torno al 0 (adimensional) con bajo sesgo positivo (figura n°.14). Los demás puntos de dosis presentan mayor simetría ($Skewness \approx 0$) con una tendencia al aplanamiento (coeficiente curtosis creciente) a medida que se incrementa el daño. Sin embargo, la prueba de normalidad establece distribución no normal en todos los puntos excepto en dos de 7 Gy (caso 1 y 5).

Los valores, en general, tienen menos dispersión en comparación con los anteriores parámetros del ensayo, como se aprecia, gráficamente, en el diagrama de cajas (figura n°. 15) el recorrido intercuartílico se mantiene estrecho a pesar del incremento del daño en el ADN, al igual que los datos atípicos.

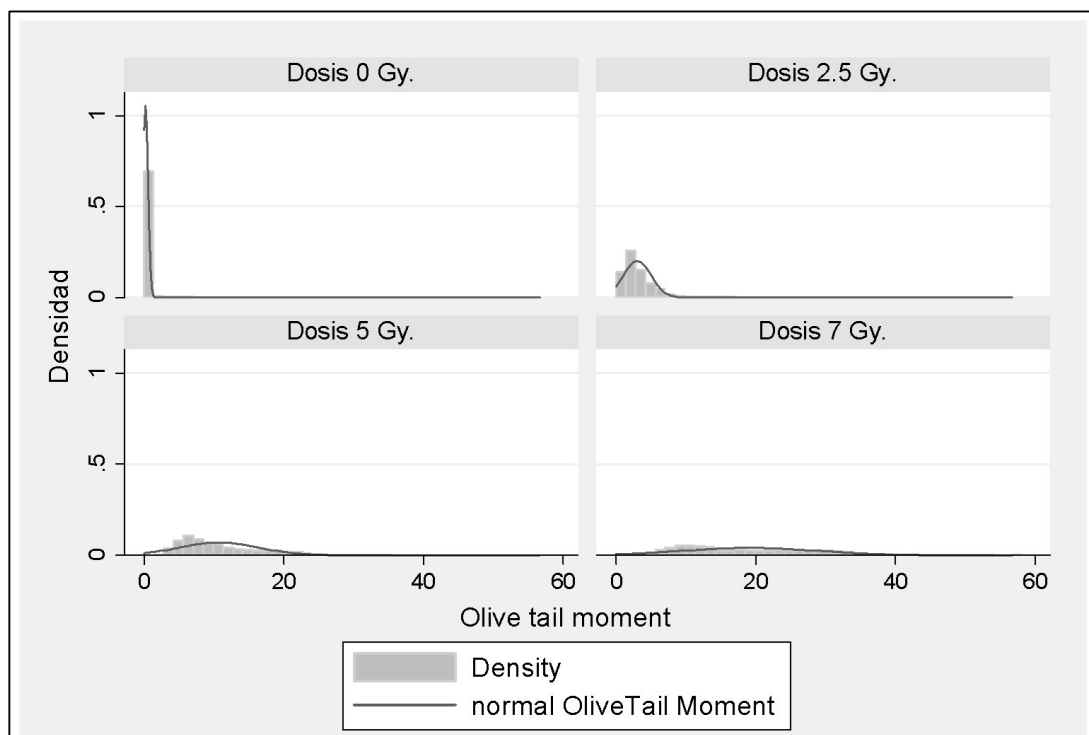


Figura n °.14 Histograma global de distribución de todos los valores del parámetro *Tail length* y por cada dosis de radiación (0, 2.5, 5 y 7 Gy).

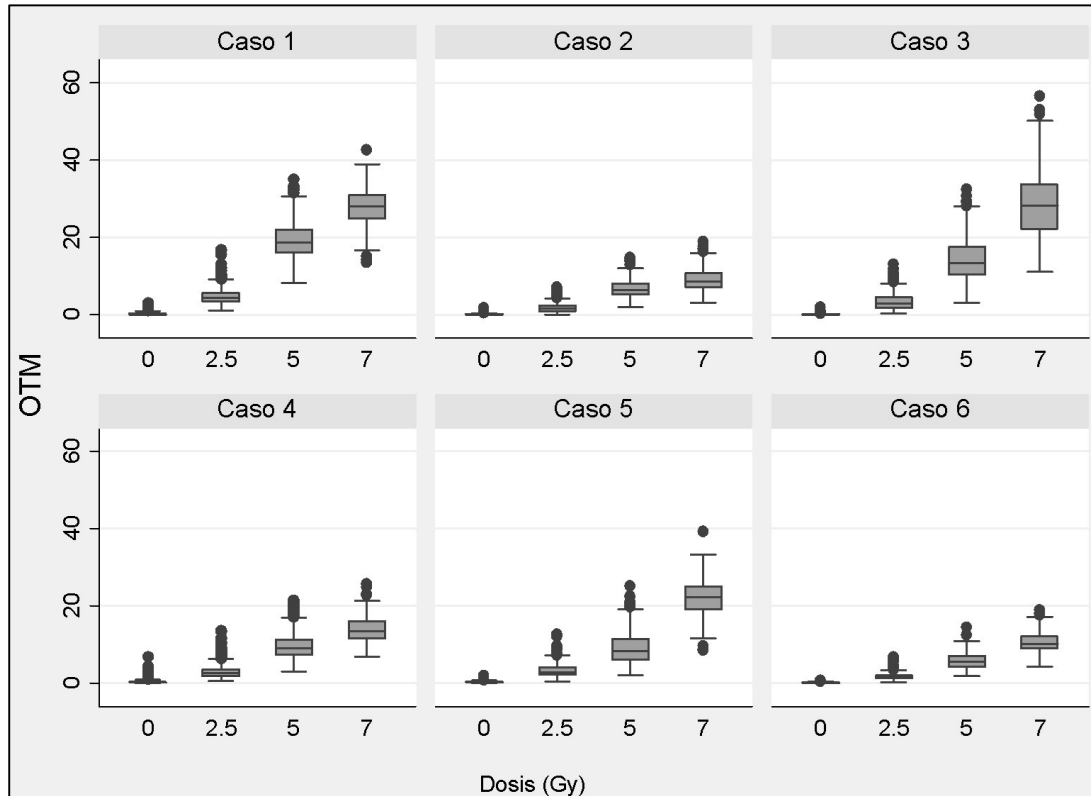


Figura n °.15 Diagrama de cajas y bigotes para los valores del parámetro *Olive Tail moment* por cada caso y dosis de radiación (0, 2.5, 5 y 7 Gy).

3.2.3.1 Relación dosis-efecto con el parámetro *Olive Tail Moment*.

Se construyeron las curvas con las medias y sus errores estándar asociados. El grafico (figura n°.16) muestra la tendencia lineal de la relación dosis-respuesta (OTM) por cada caso. Los datos derivados de ella se presentan en la tabla n°. 11. El coeficiente de correlación indica buena relación lineal, r prom. = 0.968, $DE=0.019$ y significativa, excepto para el caso 5, ($p=0.0642$) así como el coeficiente de bondad de ajuste (R^2 promedio= 0.937 D.E.=0.036). La diferencia entre las pendientes es significativa ($F=4.823$, $p=0.012$) por tanto existe variabilidad considerable entre curvas.

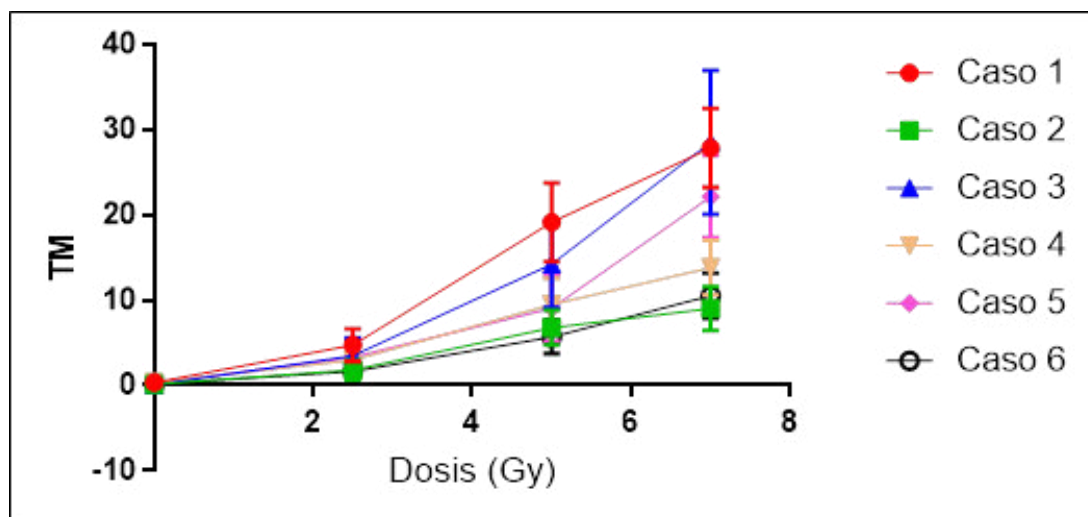


Figura n °.16 Total de curvas dosis-efecto con el parámetro *Olive tail moment* y dosis de irradiación gamma (0, 2.5, 5 y 7 Gy)

Tabla n °.11 Coeficientes de correlación y regresión lineal de las curvas dosis efecto con el parámetro *Olive tail moment* por cada caso.

	r	R ²	P (bilateral)	Pendiente	Ecuación
Caso 1	0.9796	0.9596	0.0204	4,107 ± 0,5961	Y = 4,107*X - 1,878
Caso 2	0.9824	0.9652	0.0176	1,346 ± 0,1808	Y = 1,346*X - 0,433
Caso 3	0.9566	0.915	0.0434	4,033 ± 0,8692	Y = 4,033*X - 3,046
Caso 4	0.9862	0.9725	0.0138	1,987 ± 0,2362	Y = 1,987*X - 0,5488
Caso 5	0.9358	0.8757	0.0642	2,982 ± 0,7942	Y = 2,982*X - 2,123
Caso 6	0.9672	0.9355	0.0328	1,479 ± 0,2745	Y = 1,479*X - 0,8601

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Discusión:

El ensayo cometa es un método novedoso, simple y rápido para detectar daños a nivel del ADN. Anteriores estudios han manifestado la importancia de la evaluación del ensayo en relación a los parámetros estimadores del daño genotóxico (9,66–69). En contraste a ello, esta investigación tuvo como propósito evaluar el grado de correlación por cada uno de los tres principales parámetros del Ensayo Cometa y dosis de radiación ionizante, en un modelo *in vitro* de daño genético inducido en CMSP. Se construyeron seis curvas dosis-efecto por cada parámetro, sobre las cuales se analizaron los coeficientes de correlación y ajuste con regresión lineal.

Se encontró poca información descriptiva de los datos por cada parámetro del ensayo cometa. Entre ellas la caracterizaciones del TI que realizaron Møller et al. y Ejchart et al. (65,70) son consistentes con nuestras observaciones. Se demuestra que la distribución no normal de los Cometas a dosis bajas de radiación tiende a desplazarse a la normalidad a medida que aumenta el daño inducido (dosis altas) a cambio de un incremento de la dispersión de datos. Esta característica se observa para los tres parámetros evaluados, en mayor grado por el TI seguido por OTM en base al ajuste con la prueba de normalidad.

Respecto a la pregunta de investigación, nuestros hallazgos demuestran, que existe una fuerte relación entre las estimaciones del daño al ADN, por los parámetros del ensayo cometa, y dosis de radiación ionizante. En general, los coeficientes de correlación indican una excelente relación lineal dosis-respuesta y buen ajuste de curva en el rango de dosis evaluado. No obstante, se muestran algunas particularidades, entre ellas, que sugieren mayor evaluación para su aplicación en condiciones específicas de expresión del daño al ADN.

Las mediciones no mostraron el mismo grado de correlación. El coeficiente (r) promedio para el TI, TL Y OTM fue de 0.989, 0.959 y 0.968 respectivamente. En consecuencia, el coeficiente de determinación R^2 promedio obtenido con el TI ($R^2 = 0.977$, $DE = 0.007$) fue superior a los hallados con el OTM ($R^2=0.937$ $DE=0.036$) y el TL ($R^2 = 0.92$ $DE= 0.075$). Ello concuerda con autores como Collins (71), Møller

(7) y otros en la literatura (58,72,73) que destacan el predominio del TI en cuanto a su capacidad correlacionar con las dosis de radiación.

En los ensayos intercomparativos desarrollados por la ECVAG, (10) a pesar de la discrepancia y variabilidad de resultados entre laboratorios participantes, se reportaron muy buena relación lineal y significativa del TI con las dosis de radiación; $R^2=0.97$, $DE=0.04$, $n=14$ (año 2012) y $R^2=0.985$, $DE=0.006$, $n=12$ (año 2014). Por su parte Pitozzy et al.(74) evaluó el TI mediante curvas de calibración al irradiar con rayos X $R^2=0.98$ y gamma (Co60) $R^2=0.97$ obteniendo resultados igualmente muy semejantes.

En contraste, el estudio de Kumaravel et al. (58) destaca al OTM ($R=0.9990$) seguido de TI ($R=0.9910$) entre 34 parámetros evaluados (*Komet 5.0*) con irradiación (^{137}Cs , 0, 1, 2, 4 y 8 Gy). Los resultados fueron muy similares con ligera ventaja, no significativa. Así mismo, Wang et al. (75) prefirió dicho parámetro (OTM, programa CASP) en la evaluación de la cinética de reparación del ADN con rayos gamma ^{137}Cs , 0 a 6 Gy debido a su excelente correlación R^2 promedio = 0.993 $DE=0.009$ con ajuste polinomial de la curva.

En relación al TL, hemos observado que su menor correlación podría estar influenciada por la gran variación encontrada en las muestras sin irradiación (0 Gy) y la saturación del daño que alcanza aproximadamente a la dosis de 5 Gy. Este último factor altera directamente la relación lineal de la curva, debido al fenómeno de la meseta. Este ha sido descrito anteriormente (9), por ello se ha argumentado que el TL sería un indicador condicionado a un estrecho intervalo de dosis.

Un hallazgo particular de nuestro estudio, es la presencia de dos curvas de correlación no significativas ($p>0.05$). Una correspondiente al TL (caso 4) y otra para OTM (caso 5). Por otra parte, los valores de las pendientes, en general, presentaron amplia variabilidad y diferencia significativa ($p>0.05$). No obstante, el coeficiente de variación calculado con el TI ($CV=25.48\%$) fue menor al de TL ($CV=41.78\%$) y OTM ($CV=46.6\%$).

Se evitó, en la medida de lo posible, la intervención de variables externas mediante el aseguramiento de las condiciones preanalíticas, así como las especificaciones técnicas del tratamiento con irradiación y la ejecución del ensayo protocolizado. En ese sentido, las estimaciones del daño al ADN en las CMSP pueden atribuirse, principalmente, a la exposición a radiación *in vitro*. En consecuencia, la variabilidad de resultados en la magnitud de respuesta ante las mismas dosis pudiera estar determinado por las diferencias biológicas entre los participantes.

Respecto a la variación, se manifiesta por las diferencias en las pendientes de las curvas que se ven reflejadas en la estimación de daño por dosis de radiación. Es razonable asumir dicha variación como característica inherente del método (37). Aunque se hayan mantenido condiciones estandarizadas, la técnica posee muchos puntos críticos (40) que son susceptibles a inducir sesgo más aun cuando se ejecutan en diferentes días.

Sin embargo, no se descartan otros factores que también pudieran influir como las características individuales de los participantes. La radiosensibilidad (76) que es una condición individual importante estimada en 9 % (77) de la población y que altera los resultados en el ensayo cometa (78). También se ha demostrado que la ocupación, la alimentación (79), incluso el clima (80,81) son elementos que se contribuyen. Entre las fuentes externas de error se ha visto que la irradiación igualmente podría estar implicada (82).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones y Recomendaciones.

La construcción de curvas dosis efecto con el ensayo cometa permitió evidenciar la buena correlación de los tres parámetros del programa *Comet Assay IV* con las dosis de radiación ionizante, así como la variabilidad intrínseca asociada.

Nuestros hallazgos señalan claramente que existe buena correlación lineal y significativa entre los parámetros evaluados con las dosis de radiación. Adicionalmente encontramos que los parámetros *Tail intensity* y *Olive tail moment* son los indicadores que mejor correlacionan con el aumento de dosis de radiación.

Entre los dos, el parámetro *Tail intensity* es particularmente de preferencia en este estudio debido a la menor variabilidad evidenciada estadísticamente en la evaluación de las pendientes de curvas y las características propias en la expresión de resultados

Así mismo hay que tener en consideración que el parámetro *Olive tail moment*, es un parámetro de imágenes que produce diferentes valores para interlaboratorios, por tanto, es dependiente del programa que se emplea en su valoración.

El *Tail length* muestra una pobre respuesta de tendencia lineal en comparación con los otros dos parámetros. La saturación de daño a dosis altas influye en el análisis de regresión lineal. Otro modelo de regresión podría ajustar mejor los datos.

No está clara la causa de las discrepancias que existe sobre las pendientes de curvas. Este estudio al igual que otros, informan curvas de variadas pendientes en respuesta a las mismas dosis.

En vista de las fuentes mencionadas, para futuros estudios, se recomienda que se deberían desarrollar curvas dosis efecto con líneas celulares en condiciones más rigurosas de ensayo, así como ampliar la cantidad de irradiaciones y puntos de dosis.

El siguiente paso en la línea de investigación es evaluar parámetros de calidad analítica mediante el empleo de células control criopreservadas con niveles de daño establecidos.

Otro aspecto de interés, es el estudio *in vivo* con modelos animales de experimentación para incluir variables de situaciones reales como cinética de reparación del ADN, exposición inhomogénea, tiempo y dosis de exposición, etc.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* [Internet]. Europe PMC Funders; 2009 Oct 22 [cited 2017 Jun 28];461(7267):1071–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19847258>
2. WHO Task Group on Biomarkers and Risk Assessment. Biomarkers and risk assessment : concepts and principles. World Health Organization; 1993. 82 p.
3. Mussali-Galante P, Avila-Costa MR, Piñón-Zarate G, Martínez-Levy G, Rodríguez-Lara V, Rojas-Lemus M, et al. DNA damage as an early biomarker of effect in human health. *Toxicol Ind Health*. 2005;21(October):155–66.
4. Singh N, McCoy T, Tice R, Schneider EL. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells '. *Exp Cell Res*. 1988;175:184–91.
5. Azqueta A, Langie S, Collins A. 30 Years of the Comet Assay: An Overview with Some New Insights [Internet]. 2015. Available from: http://www.frontiersin.org/books/30_years_of_the_Comet_Assay_an_overview_with_some_new_insights/675
6. Neri M, Milazzo D, Ugolini D, Milic M, Campolongo A, Pasqualetti P, et al. Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study. *Mutagenesis* [Internet]. 2015;30(1):155–63. Available from: <http://www.mutage.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/mutage/geu061>
7. Møller P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res*. 2006;612:84–104.
8. Møller P, Möller L, Godschalk RWL, Jones GDD. Assessment and reduction of comet assay variation in relation to DNA damage: Studies from the European Comet Assay Validation Group. *Mutagenesis*. 2010;25(2):109–11.
9. Forchhammer L, Johansson C, Loft S, Möller L, Godschalk RWL, Langie S a S, et al. Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial. *Mutagenesis* [Internet]. 2010;25(2):113–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19910383>

10. Godschalk RWL, Ersson C, Stępnik M, Ferlińska M, Palus J, Teixeira JP, et al. Variation of DNA damage levels in peripheral blood mononuclear cells isolated in different laboratories. *Mutagenesis* [Internet]. 2014;29(4):241–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24737269>
11. Wong VWC, Szeto YT, Collins AR, Benzie IFF. The COMET assay: A biomonitoring tool for nutraceutical research. *Curr Top Nutraceutical Res*. 2005;3(1):1–14.
12. Cook PR, Brazell I a. Characterization of nuclear structures containing superhelical dna. *J Cell Sci*. 1976;324:303–24.
13. Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. *DNA Repair Mechanisms*. 1978;IX:465–8.
14. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;123(1):291–8.
15. Olive PL. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat Res* [Internet]. 1989 Jan [cited 2017 Jun 17];117(1):79–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2913610>
16. Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999;722(1–2):225–54.
17. Rosales J. Uso de marcadores genotoxicológicos para la evaluación de agricultores expuestos a plaguicidas organofosforados. *An la Fac Med*. 2015;76(3):247–52.
18. Infantes W. Evaluación del efecto genotóxico en trabajadores expuestos a Rayos X en el Hospital Nacional Luis N . Sáenz PNP. 2014.
19. Rivera C. Determinación del daño genotóxico en trabajaadores expuestos a formaldehído de tres laboratorios de anatomía patológica de Lima Metropolitana. *FACULTAD DE MEDICINA HUMANA E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA*. 2015.
20. Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, Fernández JL, López-Fernández C, Gosálbez A, Gosálvez J. New Application of the Comet Assay. *J Histochem*

- Cytochem [Internet]. 2011;59(7):655–60. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1369/0022155411410884>
21. Spivak G. The Comet-FISH Assay for the Analysis of DNA Damage and Repair. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) [Internet]. 2010 [cited 2017 Jun 18]. p. 129–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20809308>
 22. Petersen AB, Gniadecki R, Wulf HC. Laser scanning cytometry for comet assay analysis. *Cytometry*. 2000;39(1):10–5.
 23. Enciso M, Sarasa J, Agarwal A, Fernández JL, Gosálvez J. A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(5):609–16.
 24. Vojnovic B, Barber PR, Johnston P, Gregory HC. A High Sensitivity , High Throughput, Automated Single-Cell Gel Electrophoresis (“ Comet ”) DNA Damage Assay. *Phys Med Biol*. 2013;(1):15.
 25. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis*. 2008;23(3):143–51.
 26. Bauch T, Bocker W, Mallek U, Muller WU, Streffer C. Optimization and standardization of the “Comet Assay” for analyzing the repair of DNA damage in cells. *Strahlenther Onkol* [Internet]. 1999;175(7):333–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s000660050020>
 27. Forchhammer L, Ersson C, Loft S, Moller L, Godschalk RWL, van Schooten FJ, et al. Inter-laboratory variation in DNA damage using a standard comet assay protocol. *Mutagenesis* [Internet]. 2012;27(6):665–72. Available from: <http://www.mutage.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/mutage/ges032>
 28. Langie SAS, Azqueta A, Collins AR. The comet assay: Past, present, and future. *Front Genet*. 2015;6(Aug):1–3.
 29. Collins AR, Yamani N El, Lorenzo Y, Shaposhnikov S, Brunborg G, Azqueta A. Controlling variation in the comet assay. *Front Genet*. 2014;5(OCT):1–6.
 30. Johansson C, Møller P, Forchhammer L, Loft S, Godschalk RWL, Langie SAS, et al. An ECVAG trial on assessment of oxidative damage to DNA measured by the comet

- assay. *Mutagenesis*. 2010;25(2):125–32.
31. Ersson C. International validation of the Comet Assay and a human intervention study. 2011.
 32. Al-Salmani K, Abbas HHK, Schulpen S, Karbaschi M, Abdalla I, Bowman KJ, et al. Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. *Free Radic Biol Med* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;51(3):719–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.020>
 33. Sanadi RM, Khuller N, P B, Hedge R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *J indian Assoc public Heal Dent* [Internet]. 2017;2011(18):921–2. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/MB:26:3:249>
 34. Zúñiga Venegas L. Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana. Tesis doctoral. 2009.
 35. Hartmann a., Elhajouji a., Kiskinis E, Poetter F, Martus HJ, Fjällman a., et al. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: Comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem Toxicol*. 2001;39(8):843–58.
 36. Andem A, Agbor R, Ekpo I. Review on Comet Assay : a Reliable Tool for assessing DNA damage in animal models. *J Curr Res Sci*. 2013;1(6):405–27.
 37. Ersson C, Möller L. The effects on DNA migration of altering parameters in the comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments. *Mutagenesis*. 2011;26(6):689–95.
 38. Shaposhnikov S, Azqueta A, Henriksson S, Meier S, Gaivão I, Huskisson NH, et al. Twelve-gel slide format optimised for comet assay and fluorescent in situ hybridisation. *Toxicol Lett*. 2010;195(1):31–4.
 39. Gutzkow KB, Langleite TM, Meier S, Graupner A, Collins AR, Brunborg G. High-throughput comet assay using 96 minigels. *Mutagenesis*. 2013;28(3):333–40.
 40. Sirota NP, Zhanataev AK, Kuznetsova EA, Khizhnyak EP, Anisina EA, Durnev AD. Some causes of inter-laboratory variation in the results of comet assay. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;770:16–22. Available

from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.05.003>

41. Vergara A. Estandarización del ensayo cometa alcalino en células de sangre periférica. 2010.
42. Osipov A, Arkhangelskaya E, Vinokurov A, Smetanina N. DNA Comet Giemsa Staining for Conventional Bright-Field Microscopy. *Int J Mol Sci*. 2014;15:6086–95.
43. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2001;49(9):1183–6. Available from: <http://jhc.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/002215540104900912>
44. Møller P, Loft S, Ersson C, Koppen G, Dusinska M, Collins A. On the search for an intelligible comet assay descriptor. *Front Genet*. 2014;5(JUL):3–6.
45. Collins AR, Ai-guo M, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res Repair*. 1995;336(1):69–77.
46. Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T, Hayashy M, et al. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun* [Internet]. 1995 Jan 1 [cited 2017 Jul 1];3(1):3–15. Available from: <https://www.scienceopen.com/document?vid=76ccaf08-c21c-4829-baac-9b0ad0115c90>
47. Vilhar B. Help! there is a comet in my computer! 2004.
48. Müller W-U, Bauch T, Streffer C, Niedereichholz F, Böcker W. Comet Assay Studies of Radiation-induced DNA Damage and Repair in Various Tumour Cell Lines. *Int J Radiat Biol* [Internet]. 1994;65(3):315–9. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/09553009414550371>
49. Møller P. The alkaline comet assay: Towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006;98(4):336–45.
50. Olive PL, Banáth JP, Durand RE, Banath JP. Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the “Comet” Assay. *Radiat Res* [Internet]. 1990;122(1):86. Available from:

<http://www.jstor.org/stable/3577587?origin=crossref>

51. Møller P. Measurement of DNA damage by the Comet Assay. In: Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. 2003.
52. Böcker W, Bauch T, Müller U, Streffer C. Image analysis of comet assay measurements. *Int J Radiat Biol* . 1997;72(4).
53. Møller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2005 [cited 2017 Jul 8];96 Suppl 1:1–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15859009>
54. IAEA. Radiation biology: A Handbook for Teachers and Students. International Atomic Energy Agency. Viena: Applied Radiation Biology and Radiotherapy Section; 2010. 15-26 p.
55. Tubiana M. Introduction To Radiobiology [Internet]. CRC Press; 2005 [cited 2015 May 25]. 269 p. Available from: <https://books.google.com/books?id=xiuNc-2H9UEC&pgis=1>
56. Baños MA, Alegría CL. Bases físicas y biológicas del radiodiagnóstico médico [Internet]. EDITUM; 2003 [cited 2015 Jun 1]. 86-87 p. Available from: <https://books.google.com/books?id=mtQkRFUmhgsC&pgis=1>
57. Goodhead DT. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol*. 1994;65:7–17.
58. Kumaravel TS, Jha AN. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2006;605(1–2):7–16.
59. Güerci a, Zúñiga L, Marcos R. Construction and validation of a dose-response curve using the comet assay to determine human radiosensitivity to ionizing radiation. *J Toxicol Environ Health A*. 2011;74(15–16):1087–93.
60. Carrano a. V, Natarajan a. T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res Toxicol*. 1988;204(3):379–406.
61. Instituto Peruano de Energía (IPEN). Laboratorio Secundario de Calibraciones

- Dosimétricas del Instituto Peruano de Energía Nuclear (LSCD-IPEN) [Internet]. 2016 [cited 2017 Sep 30]. Available from: <http://www.ipen.gob.pe/descargas/LSCD.pdf>
62. Wiklund S, Agurell E. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis* [Internet]. 2003;18(2):167–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/18.2.167>
 63. McArt DG, Wasson GR, McKerr G, Saetzler K, Reed M, Howard CV. Systematic random sampling of the comet assay. *Mutagenesis*. 2009;24(4):373–8.
 64. Lorenzo Y, Costa S, Collins AR, Azqueta A. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: Hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*. 2013;28(4):427–32.
 65. Møller P, Loft S. Statistical analysis of comet assay results. *Front Genet*. 2014;5(AUG):1–4.
 66. Böcker W, Bauch T, Müller WU, Streffer C. Image analysis of comet assay measurements. *Int J Radiat Biol* [Internet]. 1997 Oct [cited 2017 Jul 8];72(4):449–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9343110>
 67. Kirilova M, Ivanov R, Miloshev G. A novel parameter in comet assay measurements. *Genetika*. 2005;37(2):93–101.
 68. Kayaalti Z, Söylemez E, Yalcin S, Söylemezoğlu T. Searching of Standard Comet Assay Parameters for Detecting Lymphocyte DNA Damages Using Fourteen Different Test Conditions. *J Adv Biol*. 2010;3(3):234–41.
 69. Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN. Comet Assay measurements: A perspective. *Cell Biol Toxicol*. 2009;25(1):53–64.
 70. Ejchart A, Sadlej-Sosnowska N. Statistical evaluation and comparison of comet assay results. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 2003;534(1):85–92.
 71. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* [Internet]. 2004;26(3):249–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004294>
 72. Ueno S, Kashimoto T, Susa N, Natsume H, Toya M, Ito N, et al. Assessment of DNA

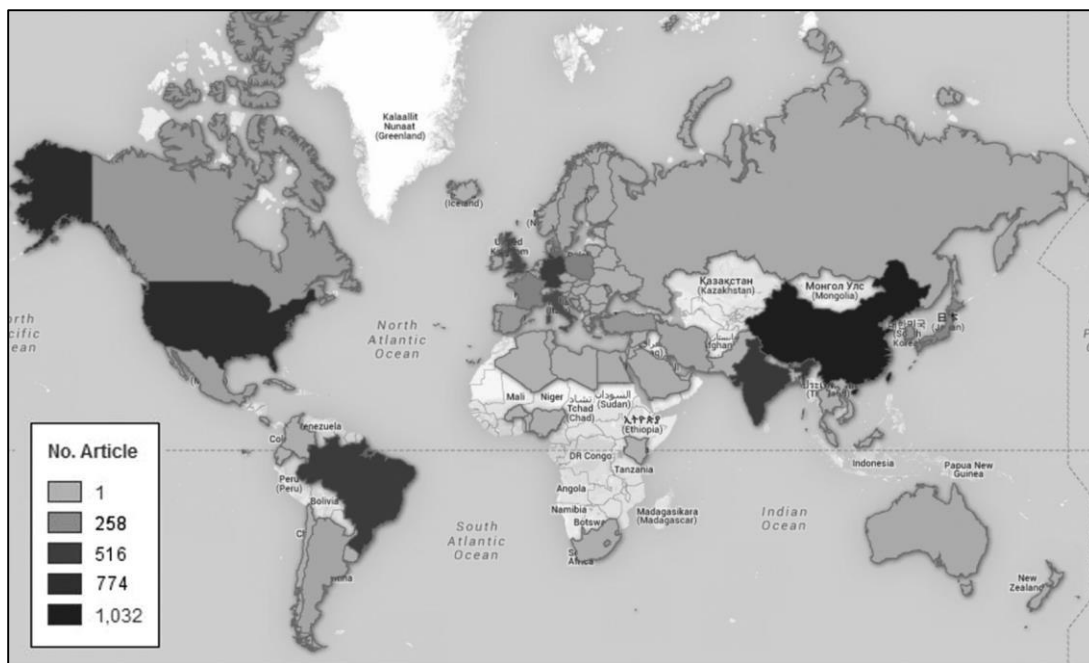
- damage in multiple organs of mice after whole body X-irradiation using the comet assay. *Mutat Res* [Internet]. 2007;634(1–2):135–45. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571807002021>
73. Güerci A; Zuñiga, L; Marcos R. Valor Predictivo del Ensayo Cometa en la evaluacion de la radiosensibilidad individual en sangre periferica. *Theoria*. 2006;15(2):41–52.
 74. Pitozzi V, Pallotta S, Balzi M, Bucciolini M, Becciolini A, Dolaro P, et al. Calibration of the comet assay for the measurement of DNA damage in mammalian cells. *Free Radic Res* [Internet]. 2006;40(11):1149–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17050168>
 75. Wang Y, Xu C, Du LQ, Cao J, Liu JX, Su X, et al. Evaluation of the comet assay for assessing the dose-response relationship of DNA damage induced by ionizing radiation. *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):22449–61.
 76. Greve B, Bölling T, Amler S, Rössler U, Gomolka M, Mayer C, et al. Evaluation of Different Biomarkers to Predict Individual Radiosensitivity in an Inter-Laboratory Comparison-Lessons for Future Studies. *PLoS One*. 2012;7(10).
 77. Scott D, Barber J, Levine E. Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? *Br J ...* [Internet]. 1998;77(4):614–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2149942/%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2149942/pdf/brjcancer00080-0104.pdf>
 78. Shahidi M, Mozdarani H, Bryant PE. Radiation sensitivity of leukocytes from healthy individuals and breast cancer patients as measured by the alkaline and neutral comet assay. *Cancer Lett*. 2007;257(2):263–73.
 79. Kažimírová A, Barančoková M, Volkovová K, Staruchová M, Krajčovičová-Kudláčková M, Wsóllová L, et al. Does a vegetarian diet influence genomic stability? *Eur J Nutr* [Internet]. Steinkopff-Verlag; 2004 Feb 6 [cited 2016 Sep 30];43(1):32–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00394-004-0436-8>
 80. Dušinská M, Vallová B, Ursínyová M, Hladíková V, Smolková B, Wsóllová L, et al.

DNA damage and antioxidants; fluctuations through the year in a central European population group. *Food Chem Toxicol.* 2002;40(8):1119–23.

81. Lebailly P, Vigreux C, Lechevrel C, Ledemeney D, Godard T, Sichel F, et al. DNA damage in mononuclear leukocytes of farmers measured using the alkaline comet assay: discussion of critical parameters and evaluation of seasonal variations in relation to pesticide exposure. *Cancer Epidemiol Prev Biomarkers.* 1998;7(10).
82. Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: A comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol.* 2013;87(6):949–68.
83. Nikjoo H. Radiation track and DNA damage. *Iran J Radiat Res.* 2003;1(1):3–16.
84. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann a., Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35:206–21.
85. JEMS/MMS. Atlas of Comet assay images. 1st ed. Hayashi M, editor. Tokio, Japón; 2014. 2-4 p.

ANEXOS.

Anexo A. Mapa de distribución geográfica mundial de publicaciones científicas con el Ensayo cometa.

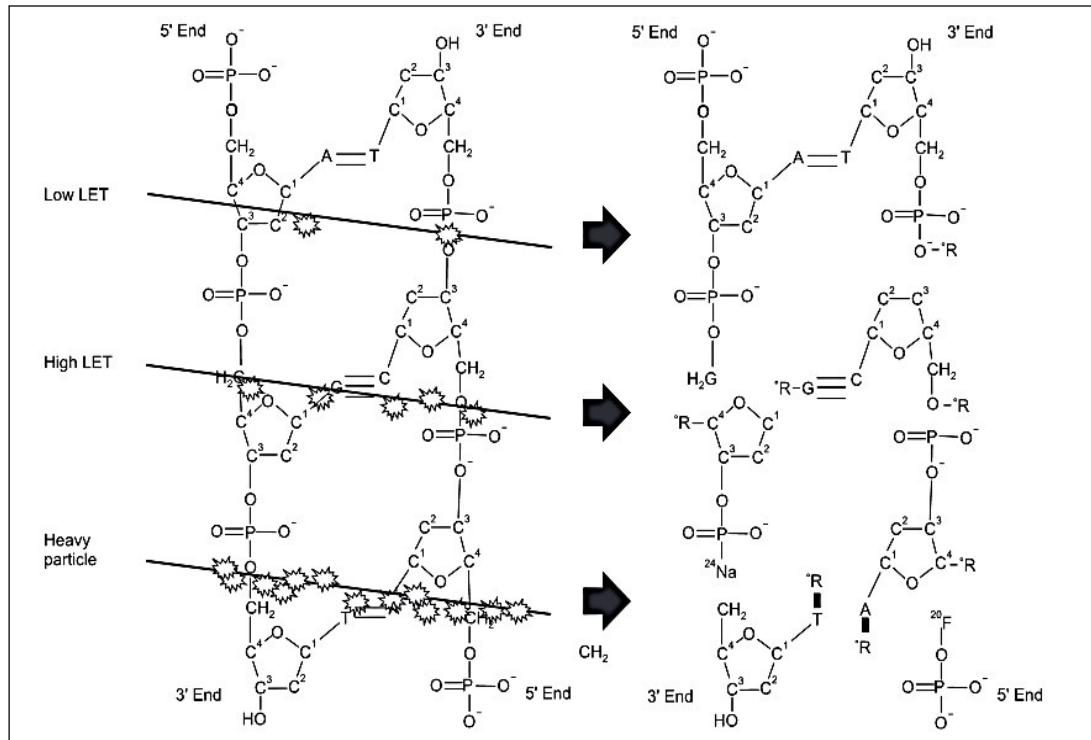


Fuente: Neri M, Milazzo D, Ugolini D, Milic M, Campolongo A, Pasqualetti P, et al. Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study. *Mutagenesis*. 2015;30(1):155–63.

A puertas del año 2000, el Ensayo cometa alcanzo su máximo apogeo en cuanto a producción científica, luego del cual se manifestó un ligero descenso, sobre todo en los países industrializados (EE.UU., Alemania, Reino Unido e Italia). Mientras que, en otros países emergentes, como China, India y Brasil aumento considerablemente. Sin embargo, ello conlleva a un decrecimiento en la calidad de los artículos científicos consecuencia del bajo factor de impacto.

Nuestro país, Perú, no figura dentro de las categorías en productividad científica, dentro del mapa. Sin embargo, en los últimos años se han realizado importantes esfuerzos que establece un precedente para nuevas investigaciones.

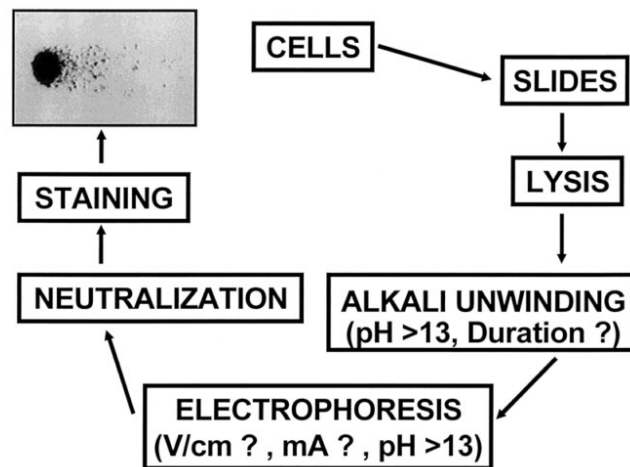
Anexo B. Interacción de las radiaciones de baja LET, alta LET y partículas pesadas con la estructura del ADN.



Fuente: NikjooH. Radiation track and DNA damage (83).

La LET es la función de la pérdida de energía por unidad de distancia, se interpreta como la cantidad de excitaciones y/o ionizaciones que causa la radiación en su viaje a través de la materia. En el esquema se aprecia la radiación de baja LET que genera radicales para causar la ruptura de una sola hebra de ADN, mientras que la radiación de alta LET causa múltiples lesiones (rotura de doble cadena) al igual que las partículas pesadas.

Anexo C. Representación esquemática de los puntos críticos del Ensayo Cometa



Fuente: Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing(84).

Anexo D. Aislamiento de linfocitos de sangre periférica con Histopaque® 1070

El aislamiento de células mononucleares, por gradiente de centrifugación, se basa en la diferencia de velocidades de sedimentación de las células de acuerdo a su densidad. Las grandes y densas migrarán más rápido que las otras. El medio comercial Histopaque provee una densidad de 1.077 g/mL, intermedia entre la densidad de eritrocitos y células mononucleares. Por lo tanto, luego de la centrifugación la solución se situará en la interface de las dos poblaciones celulares lo cual facilitará la recuperación rápida de linfocitos viables y otras células mononucleares en pequeños volúmenes de sangre total.

Reactivos y materiales

- Histopaque, densidad 1.077 g/ml Sigma-Aldrich
- Solución de Hank, PBS o RPMI
- Solución de Turk
- tubos cónicos de 15 ml
- Centrifuga, Pipetas

Procedimiento

1. Dispensamos 3 ml de histopaque 1070 en un tubo cónico falcón de 15 ml.
2. Luego dispensamos cuidadosamente (en zona) igual volumen de sangre total sobre el medio histopaque, evitar perturbar las fases entre los fluidos.
3. Centrifugar a 400 g por exactamente 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Luego, retirar los tubos de la centrífuga sin perturbar los estratos que se han formado y aspirar cuidadosamente con un micropipeta la fase turbia que contiene las células mononucleares (verificar los estratos en la figura).
5. Transfiera cuidadosamente el volumen de la interface aspirada en otro tubo cónico limpio.
6. Lavar las células mediante la adición de 10 ml de PBS isotónico o medio de cultivo celular RPMI apropiado y mezclar suavemente.
7. Centrifugar a 250 g durante 10 minutos
8. Aspirar el sobrenadante y desechar
9. Resuspender el sedimento de células con 5 ml de PBS isotónico o medio de cultivo. Si el pellet forma un botón compacto en el fondo del tubo, el cual se resuspende suavemente con el aspirado de una micropipeta.
10. Centrifugamos nuevamente a 250 g por siete minutos
11. Descarte el sobrenadante y resuspenda el sedimento celular en 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato isotónico o medio de cultivo celular apropiado.

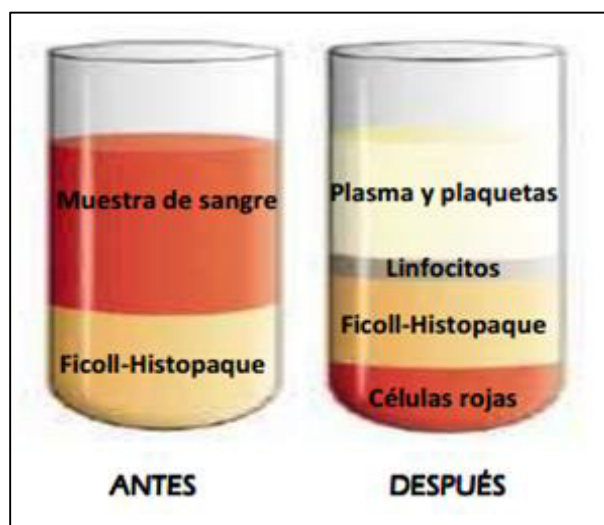


Fig. 1. Esquema de los cuatro estratos de la gradiente de densidad de la sangre con Histopaque. El primero, de abajo hacia arriba, contiene eritrocitos y granulocitos, el inmediatamente superior contiene Histopaque, luego viene es el estrato más discreto que contiene tanto a las células mononucleares como a las plaquetas y, por último, el estrato superior que contiene el plasma.

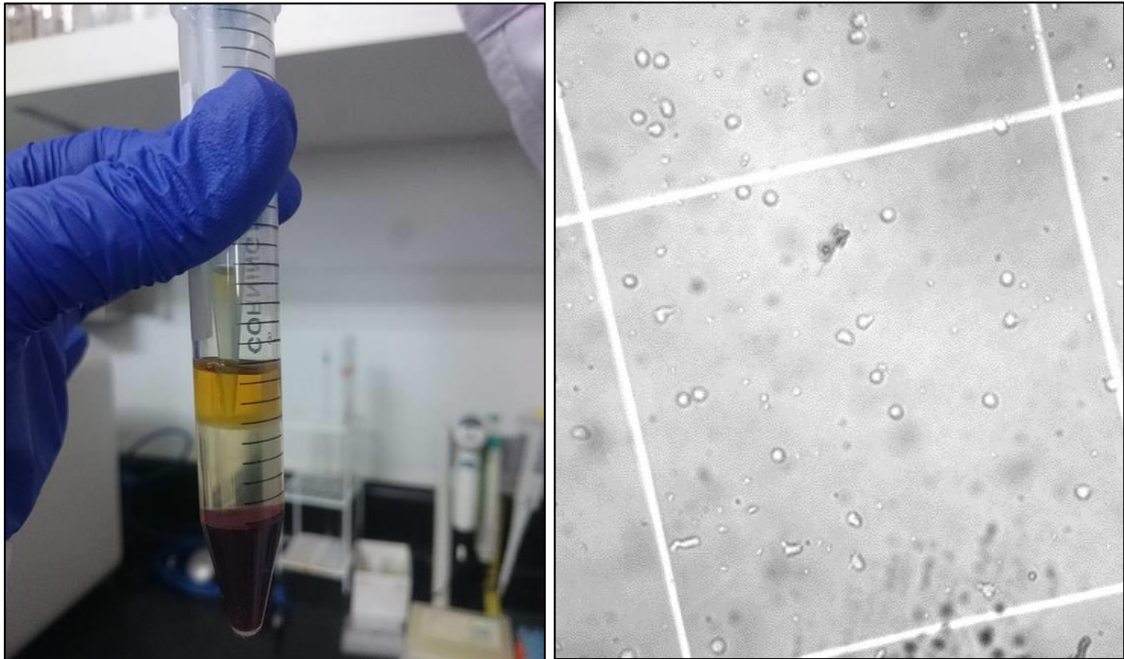


Fig. 2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica con histopaque 1070 en el Laboratorio clínico del Censopas. Los linfocitos se hacen visibles formando un anillo justo entre el plasma y el Histopaque fácilmente extraíble con el uso de micropipeta. Se aspira así aproximadamente 500 ul de células blancas

Anexo E. Ensayo Cometa en linfocitos de sangre periférica PRT MT CENSOPAS.

El ensayo cometa alcalino consiste en el aislamiento de células y su embebido en agarosa de bajo punto de fusión, para luego ser fijadas en una lámina previamente tratada. Posteriormente, mediante tratamientos en buffer de lisis y en buffer alcalino se eliminarán las membranas celulares y se desnaturizará el ADN permitiendo su exposición para luego ser colocados en electroforesis. En caso de presencia de daño en el ADN (ruptura de hebra simple o doble) los fragmentos de ADN se desplazarán

hacia el ánodo dejando una estela a modo de una cola de cometa. Los parámetros de migración del ADN serán determinados por la longitud y la intensidad de ADN en la cola mediante microscopía de fluorescencia y un software de análisis.

Condiciones previas.

Mantener las células a baja temperatura antes del procesamiento y en oscuridad dado que la sobreexposición a la luz puede generar rupturas en el ADN genómico.

Se debe evitar la presencia de hematíes en el aislado celular ya que su ruptura libera especies reactivas de oxígeno que dañan el ADN genómico.

El ensayo debe realizarse sobre células con una viabilidad mayor del 90%.

Reactivos

- Agarosa regular y Low Meeting
- Cloruro de Sodio (NaCl).
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA).
- Tris base Tritón X-100.
- Hidróxido de Sodio (NaOH).
- Ácido clorhídrico (HCl).
- Buffer fosfato salino (PBS)

Materiales:

- Microtubos tipo eppendorf de 0.6 y 1.5 mL.
- Tubos cónicos de 15 mL.
- Gradillas de microtubos.
- Cronómetro.
- Lápiz de diamante.
- Coplins con gradilla para láminas y pinzas.
- Papel toalla.
- Tips de 10, 100 y 1000 µL.
- Beaker de 1000 mL.

- Probetas de 100mL.
- Láminas porta-objetos de 26x76 mm tratadas con agarosa regular al 0.5%.
- Laminillas cubre-objetos de 22 x60 mm.

Equipos

- Micropipeta de 10, 100 y 1000uL.
- Hot plate o baño maría.
- Microondas.
- Microscopio de fluorescencia con filtro verde (longitud de onda)
- Balanza analítica.
- Vortex.
- Refrigeradora a 4°C.
- Fuente de poder y cámara de electroforesis.
- Centrífuga basculante

El esquema de la metodología

- Preparación de las láminas
- Lisis de las células (liberación de ADN)
- Desnaturalización de la doble hélice de ADN
- Electroforesis (condiciones alcalinas)
- Neutralización
- Tinción del ADN
- Visualización de los cometas y cuantificación de daño

Preparación de buffers y soluciones para ensayo cometa alcalino

Preparación de Láminas tratadas con agarosa regular al 0.5%.

1. Sumergir las láminas en etanol absoluto 96° overnight para su limpieza.
2. En simultáneo, preparar 100 mL de agarosa normal a una concentración de 0.5% en agua desionizada, de preferencia en un matraz de vidrio con tapa rosca.

3. Disolver la agarosa utilizando el microondas y homogenizar continuamente, para luego ser vertida en un contenedor de vidrio. Evitar la concentración de la agarosa por evaporación excesiva.
4. Las láminas portaobjetos sumergidas en etanol absoluto, deberán ser secadas por calor con uso del mechero o en la estufa.
5. Sumergir las láminas en un Coplin conteniendo agarosa normal al 0.5 % de tal manera que la agarosa cubra toda la lámina.
6. Dejar escurrir las láminas de forma inclinada en una gradilla sobre el papel toalla por 5 minutos aproximadamente en un ángulo de 80°.
7. Posteriormente limpiar el lado posterior de las láminas con papel toalla y dejar escurrir durante 1 minuto aproximadamente en una gradilla de láminas.
8. Colocar la gradilla conteniendo las láminas en una estufa a 40°C por 60 minutos aproximadamente. Marcar con lápiz diamante el lado de la lámina que contiene la agarosa.
9. Antes de retirar las láminas de la estufa se debe verificar que toda la agarosa se haya deshidratado.
10. La agarosa regular al 0.5% puede ser guardada a 4°C de preferencia en un beaker erlemeyer.

Preparación de agarosa Low Melting al 0.5% (ALM 0.5%)

Para preparar 50 mL de agarosa low melting (ALM) al 0.5% (0.5g/100mL) se requiere disolver 0.25 g de ALM en 50mL de buffer PBS en un beaker.

1. Utilizar horno microondas por breves periodos de tiempo (10 segundos) hasta que se disuelva la ALM procurando evitar la evaporación.
2. Posteriormente alicuotar en microtubos de 0.6 ó 1.5 mL con volúmenes de 500 y 100 µl respectivamente y sellar con parafilm.
3. Mantener a 4°C hasta el momento de su uso.
4. En el momento de su uso, licuar la agarosa low meeting a 80°C por 15 minutos y luego atemperar a 37 grados centígrados usando un hot-plate o un baño maría.

Preparación de Buffer de lisis alcalino.

Se puede preparar el buffer de lisis mediante el pesado de los componentes en su estado puro (tabla N°1) o a partir de la medición de volúmenes de soluciones stocks previamente preparados (tabla N°2).

Antes de completar el volumen a 1000 mL, se debe agregar NaOH 10N hasta alcanzar el pH de 10.0.

Esta solución podrá ser almacenada hasta por dos semanas.

TABLA N° 1. Preparación de buffer de lisis (pH: 10)			
A partir de los componentes puros			
Componente	Peso molecular	Masa (g)	Concentración final (M)
NaCl	58.44	56.25	2.5
EDTA Na2	372.2	71.65	0.5
Tris Base	121.14	46.64	1

Agua desionizada c.s.p. 1000 mL y a un pH 10

Almacenar a 4°C y en oscuridad.

TABLA N° 2. Preparación de buffer de lisis (pH: 10)			
A partir de soluciones			
Solución	Concentración inicial (M)	Concentración final (M)	Vol. inicial (mL)
NaCl	4	2.5	625
EDTA Na2 pH8	0.5	0.1	200
Tris Base pH10	1	0.01	10

Agua desionizada c.s.p. 1000 mL y a un pH 10

Almacenar a 4°C y en oscuridad.

Preparación de Buffer de electroforesis.

La preparación incluye la mezcla de NaOH y EDTA en agua desionizada a concentraciones finales de 0.3 y 0.001 M respectivamente y a un pH final de 13.5. Los componentes se pueden preparar a partir de los componentes puros (tabla N° 3).

TABLA N° 3. Preparación de buffer de electroforesis (pH: 13.5)			
Preparación a partir de componentes puros.			
Componente	Peso molecular	Masa (g)	Concentración final (M)
NaOH	40	12.0	0.30
EDTA Na2	372.2	0.372	0.001
Agua desionizada c.s.p. 1000 mL y a un pH 13.5			
Almacenar a 4°C y en oscuridad.			

1. Se agitan vigorosamente los componentes hasta disolver completamente.
2. La solución es exotérmica por lo que se debe dejar que se enfríe a temperatura ambiente antes de medir el pH.
3. Verificar el pH mayor o igual a 13 con una tira reactiva.
4. La solución de electroforesis debe mantenerse a 4°C y debe ser preparada instantes antes de ser utilizada.

Preparación de Buffer de Neutralización (pH 7.4)

El buffer de neutralización consiste en una solución de buffer tris a 0.4 M con un pH de 7.5. Para la preparación de 1 litro:

1. Pesar 48.46g de Tris Base en la balanza analítica y disolverla en aproximadamente 800 mL de H₂O desionizada como se indica en la Tabla 4.
2. Ajustar el pH a 7.4 con HCl concentrado utilizando equipos de protección personal.
3. Luego completar con agua desionizada hasta 1000mL.
4. Homogenizar bien y almacenar a 4°C.

TABLA N° 4. Preparación de buffer de neutralización 0.4 M (pH: 7.5).				
Componente	Peso molecular	Masa (g)	Concentración final (M)	Vol. final (mL)
Tris Base	121.14	48.46	0.4	1000
Agua desionizada c.s.p. 1000 mL y a un pH 7.5				
Almacenar a 4°C.				

Desarrollo del método de Ensayo cometa.

1. Realizar el aislamiento y recuento del número de CMSP en cámara de Neubauer.
2. Verificar que la viabilidad celular no sea menor del 90% con el método de Trypan blue.
3. Diluir las muestras a una concentración de 3000 a 5000 células /uL con PBS 1X o RPMI.
4. Atemperar la agarosa de bajo punto de fusión 0.5 % (ALM) a 37°C mediante un baño maría y dispensar 90 µl a un microtubo de 0.6 mL.
5. Dispensar 10 uL del concentrado celular en el microtubo conteniendo la agarosa de bajo punto de fusión 0.5 % y homogenizar despacio.
6. Colectar con la micropipeta todo el volumen del homogenizado de CMSP + ALM 0.5 % y verterlo en dos volúmenes de 50 ul sobre láminas portaobjetos tratadas con agarosa regular al 0.5 %.
7. Cubrir inmediatamente cada volumen con una lámina cubreobjetos de 22x22 mm.
8. Colocar el preparado (láminas portaobjetos que contienen las células embebidas en ALM) a 4°C por 10 minutos en oscuridad para la gelificación de la ALM.
9. Retiran las láminas cubreobjetos con cuidado utilizando pinzas, evitando arrastrar la capa de ALM gelificada.
10. El preparado será sumergido en buffer de lisis a 4°C y en oscuridad por un tiempo no menor de una hora ni mayor de 2 días. Para ello se usará gradillas y coplins.
11. Posteriormente lavar las láminas tres veces de 5 min cada una con agua desionizada para eliminar los residuos de buffer de lisis.
12. Sumergir las láminas en buffer de electroforesis (\geq pH 13) por 20 min a 4°C y en oscuridad. Hacerlo en la cámara de electroforesis.
13. Realizar la electroforesis a voltaje constante: 25 Voltios y 300 mA por 20 min a 4°C y en oscuridad.
14. Al finalizar la electroforesis se lavan las láminas con buffer de neutralización pH 7.4, 1 ó 2 veces por 5 minutos cada uno.

15. Escurrir las láminas y agregar suficiente cantidad de SYBR Gold 1X sobre la lámina por 15 min en oscuridad.
16. Cubrir con un cubreobjeto y realizar el análisis en el microscopio de fluorescencia en filtro azul y una amplificación de 100 y 200x.
17. En caso de no realizar la tinción y el análisis en el momento, deshidratar las láminas en etanol al 96% sumergiéndolas por 2 minutos o por calor ligero en un hot-plate a 40°C por 4 min hasta que toda la agarosa se deshidrate y guardar hasta su análisis.
18. Para realizar la lectura de las láminas éstas deberán ser rehidratadas con buffer de neutralización pH 7.4 por 3 minutos y luego ser teñidas con SYBR Gold por 10 min en oscuridad.
19. En caso de disponer de Bromuro de etídio, la tinción se realizará de la misma manera, sin embargo, las láminas serán observadas con filtro verde a 100 y 200x.

ALGUNOS EQUIPOS DE LABORATORIO EMPLEADOS EN EL ESTUDIO



Sistema de electroforesis para el Ensayo Cometa Alcalino. Laboratorio de Citogenética y Radiobiología (IPEN)



**Laboratorio secundario de calibraciones dosimétricas del IPEN.
Acondicionamiento del equipo de Teleterapia *Theratron Phoenix*, previo al
tratamiento de irradiación.**



**Análisis de láminas del Ensayo Cometa alcalino mediante microscopia de
epifluorescencia. Laboratorio de Investigación de efecto y susceptibilidad
(LIES), Censopas-INS**



ANEXO F

CONSENTIMIENTO INFORMADO

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA
EAP TECNOLOGÍA MÉDICA
ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA



“Correlación de los parámetros del ensayo cometa en relación a las dosis de radiación ionizante en células mononucleares sanguíneas humanas expuestas in vitro, Lima 2016”

Tesista: Bach. Lenin Vladimir Rueda Torres

Información:

El ensayo cometa es un método popular para medición del daño en el ADN por diversos agentes, debido a que es un método relativamente fácil y barato, sin embargo, se ha observado que los reportes del nivel de daño del ADN varían entre laboratorios lo cual es atribuido a la falta de consensos y condiciones analíticas, protocolos estándar etc.

En el Perú se ha implementado y aplicado la técnica en algunos centros de investigación desatendiendo este tema, por ello considerando las recomendaciones internacionales para la validación del ensayo, planteamos una evaluación experimental de la relación de los niveles de daño con dosis de radiación estandarizadas y los indicadores de nuestro ensayo que se expresan con parámetros computarizados.

Propósito:

Queremos evaluar la correlación dosis respuesta como parte de un proceso de validación de esta metodología para que sirva, a largo plazo, como marcador biológico de exposición a agentes genotóxicos

Las muestras procedentes de 6 donantes voluntarios, serán expuestas a dosis crecientes de radiación ionizante en el IPEN (Instituto Peruano de Energía Nuclear) para construir curva dosis-efecto. Los resultados de este estudio nos ayudarán a poder tener evidencia científica del desempeño de la técnica y explorar más esta línea de investigación

Participación:

La participación depende de su consentimiento, después de entender todos los aspectos del estudio, si usted nos permite, queremos hacerle algunas preguntas respecto a la salud y criterios de selección, de ser incluido, y si usted acepta

participar le solicitaremos donar una muestra sanguínea, para ello procederemos a la toma de una muestra de sangre, con una aguja estéril y 2 tubos al vacío de 9 ml cada uno.

Riesgos del estudio:

La muestra de sangre será obtenida por una sola punción en la vena de su brazo (2 tubos de 9mL), la cantidad no representa riesgo para su salud, probablemente sólo sienta un dolor leve durante la punción con la aguja.

Todo lo que usted nos informe y todos los resultados de los análisis serán mantenidos en secreto. La privacidad y confidencialidad de sus datos y resultados serán protegidas, porque toda la información obtenida a partir de su muestra y fichas será codificada y sólo tendrá acceso el investigador principal del estudio.

Beneficios del estudio:

Se le informará de sus resultados, sin embargo, estos no tienen aplicación clínica y no son fáciles de conceptualizar, se le explicará los criterios de análisis de los mismos y las recomendaciones.

Costos o estipendios:

La participación en este estudio no implica que usted haga algún pago, ni recibirá ningún tipo de asistencia financiera, resarcimiento o indemnización por esta participación.

Confidencialidad

La privacidad y confidencialidad de los datos y resultados serán protegidas, porque toda la información obtenida a partir de las muestras y fichas llenadas serán codificadas y sólo de acceso al investigador principal del estudio. Por otra parte, la información que se obtenga será publicada a través de diferentes medios escritos, pero manteniendo la confidencialidad de la identidad.

Requisitos de la participación

Consideramos para este estudio algunas variables que puedan influir en los resultados por ello se tiene en cuenta la edad de los participantes entre 18 y 45 años con goce de buena salud y que no fumen o se hayan expuesto a radiación ionizante

Problemas o preguntas:

En caso surja algún problema, pregunta, o algún daño relacionado con la

investigación, podrá contactar a los investigadores responsables Bach. Lenin Rueda Torres 10010107@unmsm.edu.pe o Jaime Rosales Rimache, Tecnólogo médico del CENSOPAS/INS.

Dirección para contacto: CENSOPAS, Calle Las Amapolas, 350, Lince, lima.
Teléfono (01)617 6200 anexo 7706, email: jrosales@ins.gob.pe

Declaración voluntaria

Consentimiento /Participación voluntaria:

Yo _____

Después de haberme informado en detalle del estudio, doy mi consentimiento de forma voluntaria para participar en esta investigación y que la información pueda ser usada con fines de investigación.

Lima, ____ de _____ del 2016

Firma del participante